

**Carla Fernanda Franco Penteado**

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
INFLAMAÇÃO AGUDA INDUZIDA PELA  
ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA DO  
TIPO B EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Dr. Edson Antunes  
Departamento de Farmacologia  
Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp

Campinas  
1999



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	EX
TELENO BC/	39864
PROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/01/00
N.º CPD	

CM-00137812-9

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

P387p

Penteado, Carla Fernanda Franco

“Participação do óxido nítrico na inflamação aguda induzida pela enterotoxina estafilocócica do tipo B em camundongos” / Carla Fernanda Franco Penteado. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

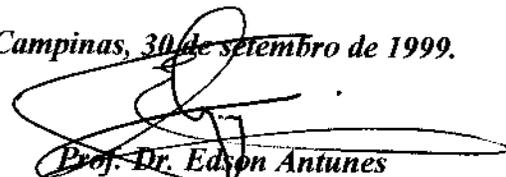
Orientador : Edson Antunes

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Migração. 2. Neutrófilos. 3. Óxido Nítrico. 4. Edema. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Carla Fernanda Franco Penteado.*

*Campinas, 30 de setembro de 1999.*

  
*Prof. Dr. Edson Antunes*  
*Orientador -*



**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Edson Antunes**

A handwritten signature in black ink, corresponding to Prof. Dr. Edson Antunes, is written over a horizontal line.

**Membros:**

1. Prof. Dr. Edson Antunes

2. Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

3. Profa. Dra. Heloisa Helena de Araújo Ferreira

A handwritten signature in black ink, corresponding to Prof. Dr. Edson Antunes, is written over a horizontal line.

A handwritten signature in black ink, corresponding to Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, is written over a horizontal line.

A handwritten signature in black ink, corresponding to Profa. Dra. Heloisa Helena de Araújo Ferreira, is written over a horizontal line.

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

**Data: 30/09/99**

## **NOTA DO ORIENTADOR**

O projeto de pesquisa que norteou esta tese foi idealizado e supervisionado nos dois primeiros anos pela Profa. Glaci Ribeiro da Silva, após o qual, a Profa., por motivos pessoais, desligou-se desta Universidade. Desde então, a mestranda Carla Fernanda Franco Penteado passou para minha orientação direta, sendo esta mudança com anuência da Sub-Comissão de Pós-Graduação em Farmacologia (FCM/UNICAMP) e FAPESP. No período em que esteve sob minha orientação, a aluna realizou novas técnicas que complementaram e substanciaram o trabalho original. Neste momento, estando o projeto concluído e a tese escrita, tomo a liberdade de compartilhar com a Profa. Glaci tanto os méritos quanto as críticas dirigidas ao mesmo.

*Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu não cochilei  
Os mais belos montes escalei  
Nas noites escuras de frio chorei  
A vida ensina e o tempo traz o tom  
Pra nascer uma canção  
Com a fé no dia-a-dia  
Encontrar a solução*

*Meu caminho só meu PAI pode mudar...*

*A Estrada (Cidade Negra)*

A Deus pela graça de viver e  
presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Chico e Regina, minhas irmãs Cherê e Juliana,  
À minha vó Nica, aos meus tios, tias e primos  
pelo carinho e incentivo.

Ao Hauke pelo apoio, compreensão e amor.

## AGRADECIMENTOS

A todos os amigos que me apoiaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho. De modo especial:

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela acolhida, amizade, pelos ensinamentos e orientação. Por quem tenho grande carinho e admiração.

A Dra. Luciane C. L. Araújo pelo ensino dos princípios básicos da Farmacologia e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela companhia nesses últimos meses e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pelo fornecimento dos materiais utilizados nos experimentos da atividade enzimática.

À Profa. Dra. Paulina Sannomiya pela doação da aminoguanidina.

À Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva pela utilização do laboratório, drogas e reagentes.

Aos professores, funcionários e colegas do Depto de Farmacologia que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

À Ivani por ter me ensinado as técnicas realizadas neste trabalho e principalmente pela amizade, apoio, sugestões e por estar sempre compartilhando minhas alegrias e tristezas.

À Alessandra pela colaboração na realização dos experimentos, pela amizade e apoio constantes.

À Sônia pela amizade desde a graduação.

À Simone pelo imprescindível auxílio na realização da técnica de medida atividade da NOS e pela amizade.

À Lúcia pela colaboração e amizade.

### **3. RESULTADOS**

<b>3.1 Efeito do L-NAME sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB</b>	
3.1.1 Administração endovenosa .....	26
3.1.2. Administração intraplantar .....	26
<b>3.2 Efeito da administração endovenosa ou intraplantar do D-NAME sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Efeito do iloprost sobre a inibição causada pela administração endovenosa do L-NAME na resposta edematogênica induzida pela SEB .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Efeito da aminoguanidina sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB</b>	
3.4.1 Administração endovenosa .....	32
3.4.2 Administração intraplantar .....	32
<b>3.5 Efeito do iloprost sobre a inibição causada pela administração endovenosa da aminoguanidina na resposta edematogênica induzida pela SEB .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 Efeito da administração intraperitoneal do 7-nitroindazol sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Efeito da aminoguanidina, L-NAME e 7-nitroindazol sobre a atividade da nNOS .....</b>	<b>39</b>

<b>3.8 Migração de neutrófilos induzida pela SEB na cavidade peritoneal</b>	
<b>3.8.1 Efeito do L-NAME e D-NAME</b> .....	42
<b>3.8.2 Efeito da dexametasona</b> .....	46
<b>3.8.3 Efeito da aminoguanidina</b> .....	48
<b>3.9 Efeito dos inibidores da NOS (L-NAME e aminoguanidina) e da dexametasona sobre o números de leucócitos mononucleares</b> .....	50
<b>3.10 Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre a atividade da NOS</b> .....	52
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	66
<b>6. SUMMARY</b> .....	67
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro bovino
C5a	5º fator do sistema complementto
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
D-NAME	N <sup>º</sup> -nitro-D-arginina-metil-éster
eNOS ou NOS III	Óxido nítrico sintase endotelial
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleucina
ILO	Iloprost
iNOS ou NOS I	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	N <sup>º</sup> -nitro-L-arginina-metil-éster
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metil-éster
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LT	Leucotrieno
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
NADPH	B-nicotinamida adenina dinucleotídeo
7-NI	7-Nitroindazol
nNOS ou NOS I	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator ativador de plaquetas

PBS	Solução salina tamponada
PG	Prostaglandina
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorido
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEB	Enterotoxina estafilocócica do tipo B
Tg	Tioglicolato de sódio
TNF	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Efeito da administração endovenosa do L-NAME sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB. 27
- Figura 2** - Efeito da administração intraplantar do L-NAME sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB. 28
- Tabela 1** - Efeito da administração do D-NAME sobre o edema de pata e exsudação do azul de Evans induzidos pela SEB. 29
- Figura 3** - Efeito do iloprost sobre a inibição produzida pelo L-NAME no edema de pata induzido pela SEB. 31
- Figura 4** - Efeito da administração endovenosa da aminoguanidina sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB. 33
- Figura 5** - Efeito da administração intraplantar da aminoguanidina sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB. 34
- Figura 6** - Efeito do iloprost sobre a inibição produzida pela aminoguanidina no edema de pata induzido pela SEB. 36
- Tabela 2** - Efeito da administração intraperitoneal do 7-nitroindazol sobre o edema de pata e exsudação do azul de Evans induzidos pela SEB. 38
- Figura 7** - Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre a atividade da nNOS. 40

<b>Tabela 3</b> - Efeito do 7-nitroindazol sobre a atividade da nNOS.	<b>41</b>
<b>Figura 8</b> - Efeito do L-NAME sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB em cavidades com o número de macrófagos normais (A) ou aumentados (B).	<b>44</b>
<b>Tabela 4</b> - Efeito da administração local do L-NAME e D-NAME do sobre o influxo de neutrófilos e leucócitos mononucleares/mastócito induzido pela SEB.	<b>45</b>
<b>Figura 9</b> - Efeito da dexametasona sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB em cavidades com o número de macrófagos normais (A) ou aumentados (B).	<b>47</b>
<b>Figura 10</b> - Efeito da aminoguanidina sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB em cavidades com o número de macrófagos normais (A) ou aumentados (B).	<b>49</b>
<b>Tabela 5</b> - Efeito da administração sistêmica dos inibidores da óxido nítrico sintase (L-NAME e aminoguanidina) e da dexametasona sobre o número de neutrófilos e leucócitos mononucleares/mastócitos em cavidades sem pré-tratamento (-Tg) ou pré-tratadas com tioglicolato (+Tg).	<b>51</b>
<b>Figura 11</b> - Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre a atividade da nNOS.	<b>53</b>
<b>Figura 12</b> - Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre a atividade da iNOS.	<b>54</b>

## LISTA DE MATERIAIS

<b>Substância</b>	<b>Procedência</b>
6-aminoindazol	Aldrich
7-nitroindazol	Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA)
aminoguanidina	Sigma
ácido acético glacial	Merck (Darmstadt, Alemanha)
azul de Evans	Sigma
crystal de violeta	Merck
Dowex-50WX80-200	Sigma
Dexametasona	Prodome
D-NAME	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Formamida	Merck
Folin & Ciocalteu's fenol reagente	Sigma
Heparina	Roche
HEPES	Sigma
iloprost	Schering
L-[2,3,4,5- <sup>3</sup> H] arginina monohidrocloreto	Amershan
L-arginina	Sigma
L-citrulina	Sigma

L-NAME	Sigma
MAY-GRUNWALD	Merck
Metanol	Merck
NADPH	Sigma
PPO	Sigma
POPOP	Sigma
PMSF	Sigma
SDS	Sigma
SEB (enterotoxina estafilocócica tipo B)	Sigma
soro albumina bovina	Sigma
Sais básicos	Merck
Tioglicolato de sódio	Difco
Toluol	Chemco
Triton X-100	Nuclear
Tween 80	Sigma
TRIS	Sigma

## RESUMO

Neste trabalho investigamos a participação do NO no edema de pata, permeabilidade vascular e influxo de neutrófilos para cavidade peritoneal induzidos pela enterotoxina estafilocócica tipo B (SEB) em camundongos. Para tanto, utilizamos inibidores não-seletivos (L-NAME) e seletivos (aminoguanidina e 7-nitroindazol) da NO-sintase, assim como a dexametasona (inibidor da indução da iNOS).

Nossos resultados mostraram que o L-NAME (7-28 mg/kg, i.v.) e aminoguanidina (25-75 mg/kg, i.v.) reduziram significativamente o edema de pata induzido pela SEB (25 µg/pata). A administração subplantar de tais inibidores também causou significante redução do edema de pata. Por outro lado, apenas as maiores doses destes inibidores (administrados pela via endovenosa) foram capazes de inibir de maneira significativa, o extravasamento de proteínas induzido pela toxina. O D-NAME (enântiômero inativo), administrado local ou sistemicamente, não alterou a resposta edematogênica induzida pela SEB. A inibição do edema de pata causada pelo L-NAME e aminoguanidina foi revertida pelo iloprost (análogo da prostaciclina), sugerindo que o efeito inibitório destes inibidores deve-se, provavelmente, à redução de fluxo sanguíneo local como consequência da inibição do NO.

A administração sistêmica do L-NAME (14-56 mg/kg), aminoguanidina (25-75 mg/kg) ou dexametasona (0,25-1,0 mg/kg) atenuou o influxo de neutrófilos induzido pela SEB em cavidades peritoneais com número de macrófagos normais. Em cavidades com o número de macrófagos aumentado, os inibidores foram menos eficazes em reduzir o influxo dessas

células. O D-NAME não afetou o influxo de neutrófilos induzido pela SEB nas duas cavidades estudadas.

Os resultados da medida da atividade da NOS mostraram que a nNOS do cérebro foi significativamente inibida pelo L-NAME 4 (28 mg/kg) e 12 h (14-56 mg/kg) após administração endovenosa deste inibidor. A aminoguanidina (75 mg/kg, i.v.) reduziu a atividade da nNOS em 4 h, mas não em 12 h após a administração sistêmica. O 7-nitroindazol (5-15 mg/kg) não modificou a nNOS em quaisquer das doses utilizadas. A atividade da iNOS foi inibida significativamente pelo L-NAME (14-56 mg/kg, i.v., 12 h) e aminoguanidina (25-75 mg/kg, i.v., 12 h).

Concluimos que o NO é um mediador importante na resposta edematogênica e no influxo de neutrófilos induzidos pela SEB. A síntese do NO, no sítio inflamatório, parece envolver a cNOS na fase inicial (4 h) e a iNOS na fase de mais tardia (12 h).

# ***1. INTRODUÇÃO***

### 1.1- Inflamação aguda

O processo inflamatório agudo representa uma reação de defesa do organismo à invasão por agentes infecciosos, danos químicos, físicos ou traumáticos. Esta reação envolve fenômenos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) e celulares (infiltração celular), decorrentes da liberação local de mediadores químicos formados e liberados concomitante ou seqüencialmente, no local da lesão tecidual. A origem desses mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento, bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, PGs, PAF, LTs, citocinas e outros). Assim, esses mediadores são os responsáveis pela gênese e (ou) manutenção dos eventos característicos do processo inflamatório (FERENCÍK & STVRTINOVÁ, 1996).

A vasodilatação se deve à ação de mediadores preferencialmente em arteríolas. Dentre estes, podemos citar a bradicinina, a histamina, metabólitos do ácido araquidônico (PGE<sub>2</sub> e prostaciclina), CGRP e outros (WILLIAMS, 1985; HOLZER, 1988). Alguns mediadores, como a bradicinina, causam vasodilatação indireta, através da liberação de óxido nítrico e prostaciclina (MONCADA *et al.*, 1991).

O aumento da permeabilidade venular se deve a ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais, induzindo contrações das mesmas. Isto permite a passagem para o interstício, de substâncias de alto peso molecular (proteínas, por exemplo), as quais não são filtradas em condições fisiológicas. Este aumento ocasiona o extravasamento de proteínas para o tecido, o qual, somado ao aumento da pressão de filtração (devido à vasodilatação) e aumento da pressão osmótica exercida pelas proteínas no

interstício, leva à saída de líquido da rede capilar para o espaço intersticial acarretando na formação de edema (tumor). A lista de mediadores que induzem o aumento da permeabilidade vascular é extensa; dentre eles, podemos citar: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF, C5a e substâncias liberadas localmente de terminações nervosas (taquicinininas) (WILLIANS, 1985).

As células envolvidas na resposta inflamatória podem estar presentes nos tecidos (células endoteliais, mastócitos, macrófagos residentes), enquanto outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue (leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares) (DALE & FOREMAN, 1989).

A mobilização dos leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório, é uma das etapas fundamentais para a defesa do organismo. A principal função dos neutrófilos, leucócitos predominantes no exsudato inflamatório na fase aguda, é a fagocitose dos agentes que desencadearam a reação inflamatória (DALE, 1984). A migração dos neutrófilos inicia-se com sua aderência à superfície das células endoteliais de vênulas pós-capilares da microcirculação local (marginação). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que mediadores como C5a, LTB<sub>4</sub>, PAF, IL-1 e o TNF aumentam a aderência dos neutrófilos ao endotélio, provavelmente por aumentarem a expressão de receptores na superfície das células endoteliais e dos neutrófilos, os quais são responsáveis pela interação entre estes dois tipos celulares (YANKEY, 1989; MACMILLAN & FOSTER, 1988; FACIOLI *et al.*, 1990). Assim, a adesão de leucócitos na parede do endotélio vascular envolve processos específicos entre moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas superfícies das células endotélias (OSBORN, 1990; MACKAY & INHOF, 1993). Estas moléculas são classificadas em 3 diferentes famílias, de acordo

com sua estrutura molecular: selectinas, integrinas e a superfamília das imonoglobulinas (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993).

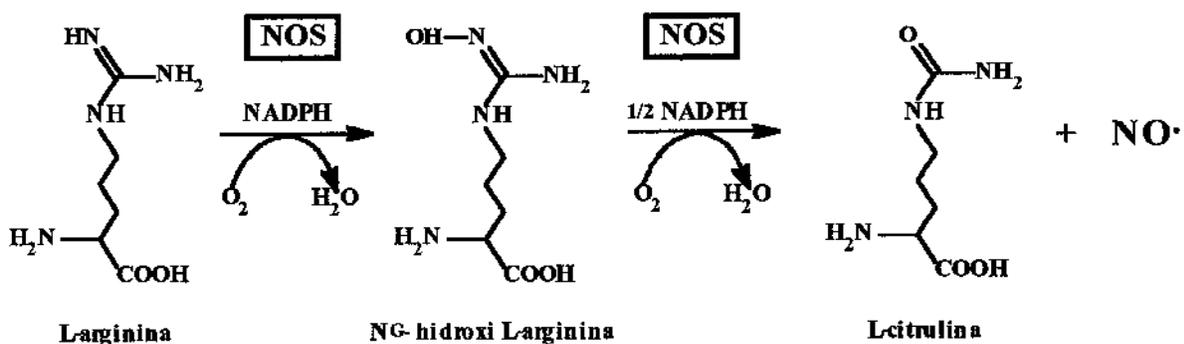
Após a aderência, os neutrófilos sofrem mudanças de forma e migram para o espaço extracelular, através das junções entre as células endoteliais. A seguir, migram até o sítio lesado, obedecendo a um gradiente químico de mediadores conhecidos como fatores quimiotáticos (HARKNESS, 1981).

Os fatores quimiotáticos incluem substâncias liberadas por células do organismo, quando estimuladas, tais como o LTB<sub>4</sub>, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, PAF e o C5a (ROSSI & HELLEWELL, 1994). Outros fatores tais como o peptídeo fMLP, caseína e dextrana são substâncias capazes de agir diretamente nos neutrófilos ativando seus mecanismos de locomoção e aderência, causando assim quimiotaxia das mesmas (WILKINSON, 1984).

Além dos mediadores citados acima, é importante ressaltar que os macrófagos residentes têm importante papel no desenvolvimento de vários eventos descritos como fase aguda da inflamação, sendo considerados células de alarme (FERREIRA, 1980). Estas células são responsáveis pela início da mobilização de neutrófilos da circulação para as regiões de dano tissular, e também pelo desencadeamento de outros eventos inflamatórios tais como edema e dor (CUNHA & FERREIRA, 1986). Estes fenômenos envolvem um número considerável de citocinas, incluindo a IL-1 e IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , sendo os macrófagos a principal fonte das mesmas (DINARELLO, 1991; RANKIN *et al.*, 1990; WHALEY & FERGUSON, 1981, RIBEIRO *et al.*, 1991).

## 1.2 - Óxido nítrico

O NO é a menor molécula biologicamente ativa do organismo. É produzido em condições fisiológicas e patológicas, a partir do aminoácido L-arginina, por uma família de enzimas denominadas NOS. A reação consiste na oxidação por oxigênio molecular ( $O_2$ ), de um dos nitrogênios do grupo guanidino terminal para NO. Esta oxidação envolve transferência de cinco elétrons e ocorre em duas etapas: na primeira, forma-se, por transferência de dois elétrons, o produto intermediário N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina; na segunda, este produto intermediário é oxidado, por transferência de mais três elétrons, formando o NO e a L-citrulina (conforme ilustrado abaixo, MACMICKING *et al.*, 1997).



Três isoformas de NOS já foram identificadas: neuronal, induzida e endotelial. Todas as isoformas são dependentes de NADPH e mostram similaridades com a citocromo P-450 redutase.

Tanto a nNOS como a eNOS são  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependentes e liberam NO por períodos curtos, enquanto que a iNOS independe de  $Ca^{2+}$  e,

uma vez expressa, sintetiza NO por períodos prolongados de tempo (MONCADA *et al.*, 1991).

A nNOS é encontrada no sistema nervoso central e periférico, sendo que o NO derivado desta isoforma tem importante papel fisiológico como neurotransmissor e mediador do metabolismo e fluxo sanguíneo no cérebro. A nNOS também pode ser encontrada em células não neuronais, tais como mastócitos, macrófagos, neutrófilos e endotélio (SCHIMDT *et al.*, 1993).

A eNOS está presente nas células endoteliais e o NO produzido por esta enzima está envolvido na regulação da pressão arterial, distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos, inibição da adesão e agregação plaquetária e inibição de certas funções leucocitárias (SOUTHAN & SZABÓ, 1996).

A iNOS é sintetizada em macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais, hepatócitos e outros tipos celulares em resposta à citocinas e endotoxinas. Esta isoforma está essencialmente presente em reações inflamatórias diversas, tanto agudas como crônicas (CLANCY & ABRAMSON, 1995; MACMICKING *et al.*, 1997).

Quando liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, onde interage com moléculas específicas como, por exemplo, o ferro, na forma reduzida ( $Fe^{2+}$ ), contido em determinadas proteínas, como a guanilato ciclase solúvel. A ligação do NO ao grupamento heme da guanilato ciclase solúvel estimula a atividade catalítica desta enzima, levando à formação de GMP cíclico (GMPc). Assim, é o acúmulo intracelular deste segundo mensageiro o responsável pela maioria das ações biológicas do NO incluindo relaxamento vascular e inibição da atividade plaquetária (Moncada & Higgs, 1993).

Através do uso dos inibidores de NOS, tem sido possível estudar o papel do NO endógeno em diversos eventos fisiopatológicos. Dentre os inibidores de NOS, destacam-se os análogos da L-arginina os quais são inibidores competitivos e não seletivos das isoformas de NOS. Dentre eles, podemos citar o L-NMMA, L-NIO e L-NAME. Os isômeros L são inibidores mais efetivos da NOS do que os isômeros D correspondentes (MONCADA *et al.*, 1997).

Outros compostos não derivados da L-arginina têm sido também descritos como inibidores da NOS, tais como: guanidinas, imidazóis, 7-nitroindazóis e azul de metileno (SOUTHAN & SZABÓ, 1996). Dentro deste grupo existem compostos seletivos para a NOS; este é o caso da aminoguanidina que inibe seletivamente a iNOS (CORBETT *et al.*, 1992) e o 7-nitroindazol que inibe preferencialmente a nNOS (MOORE *et al.*, 1993).

Além disso, os glicocorticóides, como a dexametasona, inibem a indução de iNOS em macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, mas não afetam a expressão das NOS (Di ROSA *et al.*, 1990; RADOMSKI *et al.*, 1990).

A participação do NO na resposta inflamatória tem sido bastante documentada. HUGHES *et al.* (1990), utilizando inibidores como o L-NAME e o L-NMMA, demonstraram que o NO participa da formação do edema induzido pela substância P na pele de ratos. Utilizando estes mesmos inibidores, outros autores demonstraram que o NO modula a formação do edema de pata em ratos induzido tanto pela carragenina (IALENTI *et al.*, 1992; MEDEIROS *et al.*, 1995) como pela dextrana (IALENTI *et al.*, 1992). No entanto, o mecanismo pelo qual o NO exerce seu efeito não está bem elucidado e os dados são muitas vezes conflitantes. Enquanto alguns autores acreditam que o NO modula a formação do edema através da vasodilatação local, outros

acreditam que este mediador tem uma participação direta na permeabilidade vascular (HUGHES *et al.*, 1990; MAYHAN, 1992).

Em relação ao acúmulo de neutrófilos nos sítios inflamatórios, vários trabalhos sugerem que o NO está envolvido neste evento, mas os resultados ainda não são esclarecedores. Assim, por exemplo, em vênulas mesentéricas, a inibição do NO aumenta a adesão de neutrófilos através de um mecanismo relacionado com a molécula de adesão CD18 (KUBES *et al.*, 1991). Por outro lado, trabalhos *in vitro*, mostram que a inibição de NO atenua a quimiotaxia de neutrófilos (KAPLAN *et al.*, 1989; BELENKY *et al.*, 1993).

### 1.3 - Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas são neurotoxinas produzidas e excretadas por algumas cepas do *Staphylococcus aureus*. Essas toxinas induzem uma série de alterações fisiopatológicas em humanos e animais, as quais podem levar à incapacitação, choque e morte (LeCLAIRE *et al.*, 1995).

As SE são proteínas básicas com peso molecular entre 25.000 - 30.000 e estruturalmente semelhantes entre si; são estáveis em meio ácido e temperatura elevada. As SE são classificadas por critérios imunológicos em cinco tipos diferentes, designados alfabeticamente de A a E (BERGDOLL, 1979, 1989; IANDOLO, 1989). Esta família de enterotoxinas funciona como “superantígenos” (BOBAK & GUERRANT, 1992), e acredita-se que parte de suas ações deve-se ao este efeito imunomodulador (FLEISCHER *et al.*, 1989; MARRAK & KAPPLER, 1990).

A SEB foi a primeira a ser obtida de forma altamente pura e em grande quantidade. Tanto a seqüência de aminoácidos, como o peso molecular (28.366 daltons) da SEB já foram determinados (BERGDOLL, 1979).

A administração da SEB em camundongos induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios incluindo o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 e o NO (MIETHKE *et al.*, 1992; GONZALO *et al.*, 1994; HASKÓ *et al.* 1998; FLORQUIM *et al.*, 1994), sendo que, este último parece exercer efeito protetor contra o choque tóxico induzido por esta toxina em camundongos. Este fato está baseado na verificação de que a administração prévia de L-NAME acentua o choque letal produzido por esta toxina (FLORQUIM *et al.*, 1994).

De fato, toxinas bacterianas são conhecidas por estimularem a liberação de vários mediadores inflamatórios de células de defesa do organismo (FLEMING *et al.*, 1991). Os macrófagos são uma das principais células residentes que, ao sofrerem ativação por estas toxinas, podem liberar PGs, LTB<sub>4</sub>, IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  e o NO. Esses mediadores estão envolvidos em eventos inflamatórios tais como migração de leucócitos, permeabilidade vascular, febre e dor (FERREIRA, 1993; DINARELLO, 1991; CUNHA *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 1991; KLUGER, 1991).

A injeção intraplantar de SEB no camundongo, produz edema bifásico e de longa duração. A fase primária (inicial) deste edema dura cerca de 24 horas (edema agudo), sendo seguida por uma fase secundária (ou tardia) que se inicia após 24, e continua até as 72 h (edema crônico). Vários mediadores químicos parecem contribuir para a formação desta reação edematogênica como o PAF, histamina e metabólitos do ácido araquidônico. Em relação aos metabólitos do ácido araquidônico, existe uma diferença marcante entre as duas fases deste edema, ou seja, enquanto os produtos da lipoxigenase estão envolvidos na fase

aguda, os da cicloxigenase podem estar envolvidos na fase crônica (DESOUZA *et al.*, 1996).

A SEB induz também migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, sendo este efeito dependente da dose e tempo de administração (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996). O tratamento dos animais com tioglicolato (agente utilizado para aumentar o número de macrófagos residentes) potencializa o influxo de neutrófilos induzido pela SEB. Além disso, a lavagem da cavidade peritoneal dos animais (método utilizado para remover os macrófagos) causa redução significativa do influxo de neutrófilos induzidos pela SEB. Estes dados sugerem que o influxo de neutrófilos em resposta à SEB depende de macrófagos residentes. O tratamento prévio dos animais com antagonista de PAF (BN52021) ou inibidor de lipoxigenase (BWA4C) é também capaz de inibir a resposta quimiotática induzida pela SEB. Por outro lado, tanto a indometacina (inibidor de cicloxigenase) como a difenidramina (antagonista H<sub>1</sub>) mostram-se ineficazes em reduzir a atividade quimiotática da SEB. Além disso, tanto o edema de pata, como a migração de neutrófilos peritoneais induzidos pela SEB em camundongos, são inibidos por capsaicina, substância empregada para depletar terminações nervosas de fibras sensoriais (DESOUZA *et al.*, 1996; DESOUZA e RIBEIRO-DASILVA, 1996). Este fato sugere que a SEB produz neste animal uma inflamação neurogênica na qual estão envolvidos certos neuropeptídeos como, por exemplo, a substância P.

Como descrito anteriormente, têm surgido evidências recentes mostrando que o NO modula também a migração celular (REYES *et al.*, 1994; LEIBOVICH *et al.*, 1994; NOIRI *et al.*, 1996). O efeito quimiotático para neutrófilos, induzido pela SEB, é macrófago-dependente (DESOUZA &

RIBEIRO-DASILVA, 1996), sendo tais células consideradas fonte importante de produção de NO na inflamação (McCALL *et al.*, 1991; KOLLS *et al.*, 1994). O NO pode ser produzido por macrófagos ativados por LPS e/ou citocinas (HIBBS *et al.*, 1990). Como existem várias semelhanças entre os efeitos do LPS e da SEB (BERGDOLL, 1989), e a NOS pode ser induzida *in vitro* pela incubação de monócitos com proteínas tóxicas produzidas pelo *Staphylococcus aureus*, que possuem propriedades biológicas em comum com as SEs (ZEMBOWICZ & VANE, 1992), é possível que o NO esteja envolvido no efeito quimiotático da SEB. Além disso, como descrito anteriormente, as SEs são potentes liberadoras de várias citocinas tais como IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (BERGDOLL, 1989; MICUSAN & THIBODEAU, 1993), algumas das quais conhecidas por induzir a iNOS (MACMICKING *et al.*, 1997).

Considerando-se os dados de literatura ora apresentados, a investigação do envolvimento do NO na inflamação aguda induzida pela SEB em camundongos, poderá contribuir para o esclarecimento do(s) mecanismo(s) envolvido(s) na fisiopatologia desta toxina.

## 1.4 - Objetivos

O objetivo deste trabalho foi, de modo geral, investigar o envolvimento do NO nos eventos vasculares (edema de pata e exsudação plasmática) e celulares (migração de neutrófilos) da resposta inflamatória induzida pela SEB em camundongos. Os objetivos específicos foram:

1. Investigar o efeito de inibidores da NOS (L-NAME, aminoguanidina e 7-nitroindazol) sobre a exsudação de proteínas e edema de pata induzidos pela SEB;

2. Investigar o efeito de inibidores da NOS (L-NAME e aminoguanidina) e dexametasona sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB na cavidade peritoneal de camundongos.

## ***2. MATERIAIS E MÉTODOS***

## 2.1- Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Esses animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos à 24°C, com um período de iluminação diária de 12 h e com água e alimentação “ad libidum”.

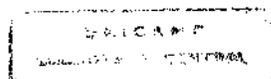
## 2.2 - SEB

A SEB foi dissolvida em soro fisiológico tamponado (PBS) estéril ou salina 0,9% e a solução-estoque armazenada na geladeira.

## 2.3 - Medida do edema de pata e exsudação plasmática

O edema de pata foi medido pelo método de LEVY (1969) e a exsudação de proteínas plasmáticas pelo método de extração do azul de Evans (GAMSE *et al.*, 1980).

Os animais receberam intravenosamente (0,01 ml/g de peso), uma solução de azul de Evans (25 mg/kg) imediatamente antes da injeção do estímulo. Após a anestesia com éter, injetou-se na região intraplantar da pata posterior esquerda (PE), 0,05 ml de SEB (25 µg/pata) o mesmo volume de veículo (salina 0,9 %) foi injetado na pata posterior direita (PD). O edema e a exsudação plasmática foram analisados 4 h após a injeção do estímulo. Para tanto, os animais foram sacrificados sob anestesia com éter e suas patas



posteriores seccionadas com instrumental cirúrgico, na articulação tíbio-tarsal. Em seguida, a PE e a PD foram pesadas em balança analítica. O edema foi avaliado pela variação do peso em mg, da PE em relação à PD.

Para extração do azul de Evans, após a medida do edema, as patas foram picadas e colocadas em tubos de ensaio contendo 3 ml de formamida. Estes tubos foram mantidos em banho-maria à 57°C, por 24 h. A quantidade de azul de Evans extravasada foi determinada por espectrofotometria com leituras feitas em 619 nm. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão, a qual foi obtida acrescentando-se concentrações crescentes (0,5-25 µg/ml) do corante em diferentes tubos contendo formamida (LYKKE & CUMMINGS, 1969). Os dados foram expressos em µg de azul de Evans/g de tecido.

#### **2.4 - Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal**

Todas as etapas que estão descritas abaixo foram realizadas em condições assépticas, utilizando-se para isto, uma câmara de fluxo laminar vertical. Tanto as soluções como as vidrarias utilizadas foram autoclavadas a 127°C, durante 1 h.

A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após o estímulo lesivo, de acordo com a técnica descrita por SOUZA *et al.* (1988). Para isto, os animais foram sacrificados sob anestesia com éter e a cavidade peritoneal lavada com 3 ml de uma solução de PBS contendo heparina e soro albumina bovina. Após massagem delicada no abdômen do animal, foi retirado o maior volume possível de lavado.

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se 20  $\mu$ l do lavado diluídos em 400  $\mu$ l de solução de Turk.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas; para isso, 80  $\mu$ l do lavado foram centrifugados em uma citocentrífuga e as lâminas coradas com May-Grünwalds. A leitura foi feita em um microscópio ótico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina, foram contadas 100 células diferenciando-se 4 tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares e mastócitos.

Para cada tipo celular, foi calculado o percentual encontrado no lavado em relação à contagem total de leucócitos.

## **2.5 - Aumento do número de macrófagos peritoneais**

O número de macrófagos peritoneais foi aumentado pela administração intraperitoneal de Tg (2 ml/cavidade de uma solução a 3%) como descrito por RIBEIRO *et al.* (1990). Após 4 dias, a SEB (125  $\mu$ g/cavidade) foi injetada na cavidade peritoneal destes animais e a migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após a administração do estímulo.

A efetividade do tioglicolato de sódio foi analisada através do número de macrófagos encontrados na cavidade de animais que receberam apenas Tg, comparado com o número de macrófagos encontrados em cavidades que receberam nas mesmas condições, ao invés de Tg, salina estéril.

## 2.6 - Medida da atividade da óxido nítrico sintase

A determinação da atividade da NOS está baseada na conversão da [ $^3\text{H}$ ]L-arginina para [ $^3\text{H}$ ]L-citrulina, conforme descrito por FORSTERMANN *et al.* (1990). Este método foi aplicado na quantificação da atividade da nNOS em cérebros de camundongos enquanto a atividade da iNOS foi avaliada em pulmões de animais tratados com LPS (10 mg/kg, i.v., 12 h antes). A atividade da nNOS foi investigada em animais controle (administrados com salina 0,9%) ou pré-tratados com L-NAME, aminoguanidina ou 7-nitroindazol. A atividade da iNOS em foi investigada em animais controle (administrados com salina 0,9%) ou pré-tratados com L-NAME e aminoguanidina.

Cada cérebro ou pulmão foram rapidamente retirados, pesados e homogenizados em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCL 50 mM, pH 7.4) contendo 1mM de PMSF e 1mM de L-citrulina. Cinquenta microlitros do homogenato foram incubados na presença de 1 mM de NADPH, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 10  $\mu\text{M}$  de L-arginina contendo 100,00 dpm de [ $^3\text{H}$ ]L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100  $\mu\text{l}$  a temperatura ambiente (25-27  $^\circ\text{C}$ ) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF nem L-citrulina). Todas as amostras foram processadas em duplicata

Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5.4 contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (2' a 10,000 rpm), e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em "vials" de cintilação (tolueno/Triton X-100/PPO/POPOP) onde a radioatividade foi medida durante

em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do “branco”. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à atividade total pela fórmula:

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

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 Peterson (1977), e a atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

Para cada cérebro ou pulmão foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do  $\text{CaCl}_2$  e na adição de 1mM de EGTA ao meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS), e na adição de 1mM de L-NAME (inibição específica para NOS). Os dados da atividade da iNOS foram expressos na ausência de cálcio enquanto da nNOS na presença do mesmo.

## 2.7 - Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo método descrito por Lowry, modificado por PETERSON (1977) o qual emprega o SDS para a solubilização de possíveis interferentes lipídicos das amostras. Todas as soluções foram usadas em temperatura ambiente. Os tubos foram agitados em vórtex após cada pipetagem. Todas as amostras foram processadas em duplicata.

As amostras biológicas foram diluídas em água destilada. Quinhentos microlitros da amostra devidamente diluída foram incubados em temperatura ambiente, e durante 10 min junto à 500  $\mu$ l do reagente I. A seguir, a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 40 min com 250  $\mu$ l do reagente II.

As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 700 nm contra água destilada.

Uma curva padrão de BSA em concentrações compreendidas entre 5 e 50  $\mu$ g/ml foi processada paralelamente às amostras biológicas.

Os valores do conteúdo de proteína foram expressos em mg/ml e calculados a partir da reta obtida por mínimos quadrados entre as inversas das absorvâncias corrigidas e as inversas das concentrações de proteínas ( $[BSA]^{-1}$  vs.  $[A]^{-1}$ ).

## 2.8 - Protocolos experimentais

2.8.1. - Efeito da administração sistêmica dos inibidores da NOS sobre o edema de pata e a exsudação plasmática induzidos pela SEB

Os animais (n=5) receberam L-NAME (7, 14 ou 28 mg/kg) , D-NAME (28 mg/kg) ou aminoguanidina (25, 50 ou 75 mg/kg) pela via endovenosa imediatamente antes da SEB. O 7-nitroindazol (5, 10 ou 15 mg/kg) ou 6-aminoindazole (15 mg/kg) foram administrados pela via intraperitoneal 0,5 h antes do estímulo.

2.8.2. - Efeito da administração local dos inibidores da NOS sobre o edema de pata e a exsudação plasmática induzidos pela SEB

Os animais (n=5) receberam L-NAME (0,07; 0,14 ou 0,28 mg/pata), D-NAME (0,28 mg/pata) ou aminoguanidina (0,10; 0,25 ou 0,5 mg/pata) concomitantemente à SEB pela via intraplantar.

2.8.3. - Efeito do Iloprost sobre o edema de pata induzido pela SEB

O iloprost é um análogo sintético da prostaciclina e, como tal, causa vasodilatação local e sistêmica. Assim, investigamos o efeito da administração local de iloprost (0,3 nmol/pata, 1 h antes da medida do edema; n=5) em animais controles ou tratados com L-NAME (28 mg/kg, iv) ou aminoguanidina (75 mg/kg, i.v).

#### 2.8.4. - Efeito dos inibidores da NOS e da dexametasona sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB

Os animais (n=5) receberam L-NAME (14, 28 ou 56 mg/kg), D-NAME (28 mg/kg) ou aminoguanidina (25, 50 ou 75 mg/kg) pela via endovenosa (ev) imediatamente antes da SEB. A dexametasona (0,25, 0,5 ou-1 mg/kg) foi administrada subcutaneamente 1 h antes da administração do estímulo.

O L-NAME foi também co-injetado com a SEB (125 µg/cavidade) nas doses de 1,4 ou 2,8 mg/cavidade. O D-NAME (2,8 mg/cavidade) foi injetado nas mesmas condições descritas acima.

#### 2.8.5 - Efeito dos inibidores da NOS sobre a atividade da nNOS e iNOS

Com a finalidade de avaliar se as doses dos inibidores de NO utilizados neste estudo foram efetivas, decidimos, medir a atividade da nNOS (4 e 12 h) e iNOS (12 h) em animais controle (injetados com salina) ou pré-tratados com L-NAME (14, 28 ou 56 mg/kg, i.v.; n=4) e aminoguanidina (25, 50 ou 75 mg/kg, i.v.; n=4). O 7-nitroindazol foi avaliado somente quanto à sua capacidade de inibir a nNOS. Este composto foi injetado pela via intraperitoneal 4,5 h antes do experimento nas doses de 5, 10 ou 15 mg/kg. Um outro grupo de animais recebeu este inibidor na dose de 15 mg/kg, 0,5 h antes da medida da atividade da nNOS.

## 2.9 - Preparo de soluções, drogas e reagentes

### Aminoguanidina

A aminoguanidina foi diluída em PBS ou salina 0,9% imediatamente antes de cada protocolo experimental.

### 6-aminoindazol

O 6-aminoindazol foi diluída em salina 0,9% imediatamente antes de cada protocolo experimental.

### Corante May-Grünwalds

- 2,5 g de corante May-Grünwalds
- Metanol absoluto q.s 1 L

### Dexametasona

A solução de dexametasona foi feita em salina à partir de ampolas na concentração de 4 mg/ml. A solução-mãe foi armazenada em geladeira. A diluição subsequente foi preparada imediatamente antes do experimento.

### L-NAME e D-NAME

O L-NAME (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster) e o D-NAME (N<sup>ω</sup>-nitro-D-arginina-metil-éster) foram diluídos em PBS e armazenados a -20 °C. As diluições subsequentes, feitas em PBS ou salina, foram preparadas imediatamente antes de cada experimento.

### 7-Nitroindazol

O 7-nitroindazol foi diluído imediatamente antes de cada experimento, inicialmente em Tween-80 e o volume final completado com salina 0,9% (1:30).

### PBS

- 5 ml de tampão fosfato 1M (pH 7.4-7.5)
- 50 ml de NaCl 1.5M
- Água deionizada qs 500 ml

A solução trabalho foi obtida pela diluição (1:10) da solução acima.

### Tioglicolato de sódio

A solução de 3% de tioglicolato de sódio foi feita em água destilada, e posteriormente esterilizada em autoclave.

### Reagente I

- 0,2% de sulfato cúprico pentahidratado
- 0,4% de tartarato de sódio e potássio
- 20% de bicarbonato de sódio
- hidróxido de sódio 0,8N
- SDS 10%
- água destilada.

## Reagente II

- Folin Ciocalteu 2N diluído em dois volumes de água destilada

## Solução PBS de lavagem

- 10 ml de PBS concentrado
- 1 ml de soro albumina bovina
- 0,1 ml de heparina 5UI/ml
- água destilada q.s. 100 ml

## Solução de Turk

- 3 ml de ácido acético glacial
- 0,1 ml de cristal violeta à 1%
- água destilada q.s. 100 ml

### **2.10 - Análise estatística**

Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. As diferenças entre as médias foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, de acordo com programa estatístico INSTAT. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significantes.

### ***3. RESULTADOS***

### **3.1 - Efeito do L-NAME sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB**

#### **3.1.1 -Administração endovenosa**

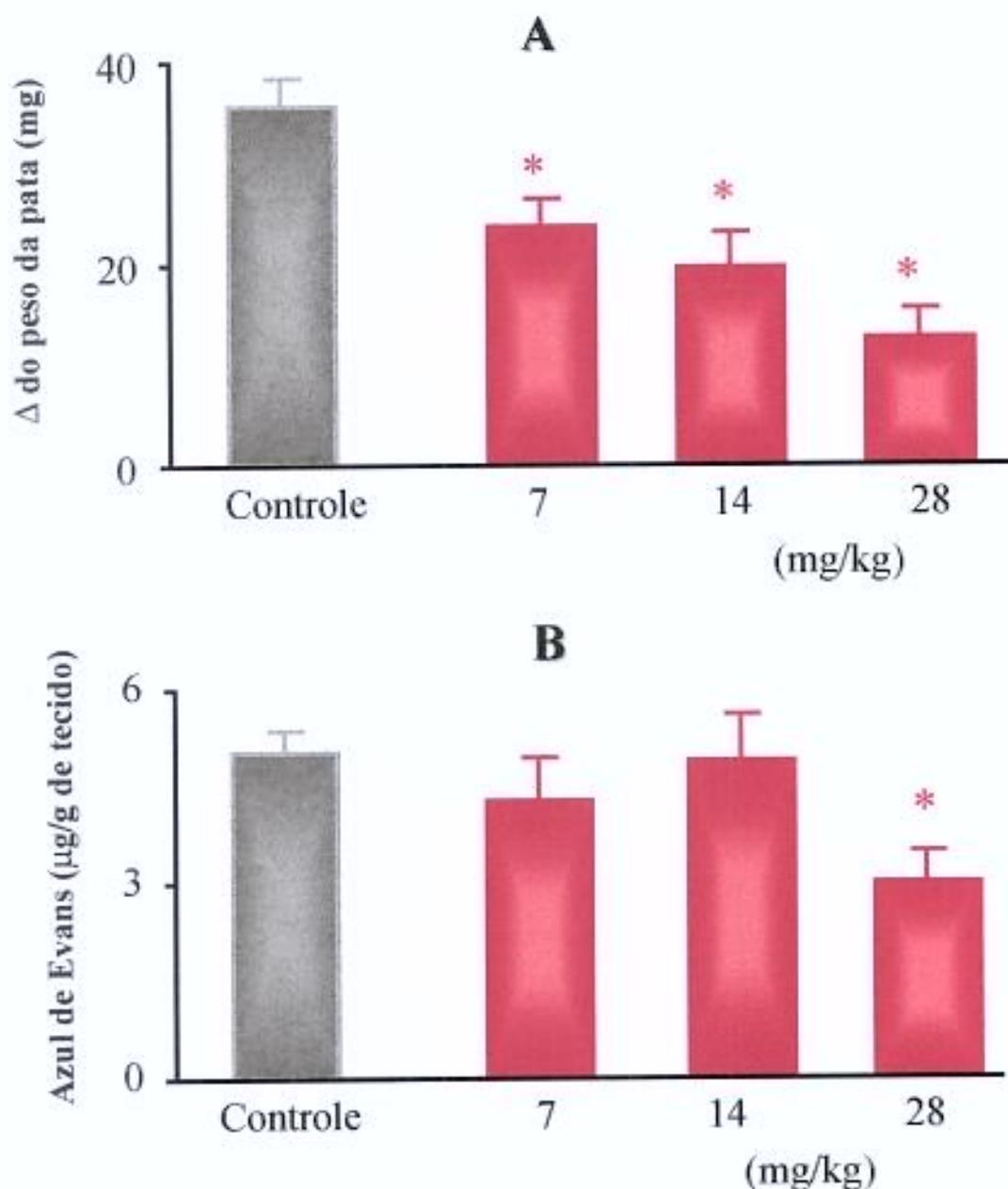
A figura 1A mostra que o L-NAME (7-28 mg/kg) inibe de maneira dose-dependente o edema de pata induzido pela SEB. No entanto, a exsudação plasmática foi inibida apenas pela dose maior de L-NAME (Figura 1B).

#### **3.1.2 - Administração intraplantar**

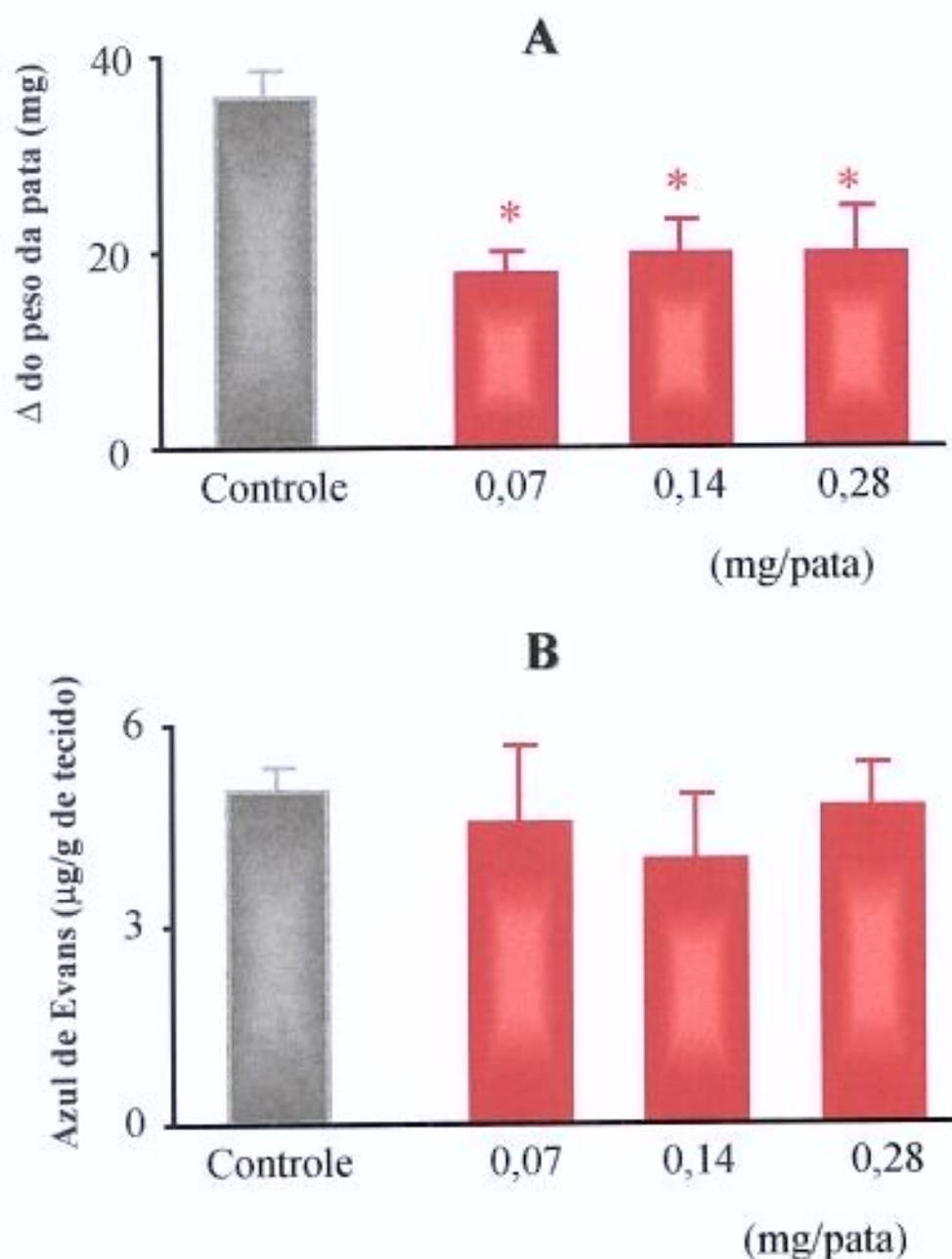
O L-NAME (0,07-0,28 mg/pata) também foi eficiente em inibir o edema de pata induzido pela toxina, quando administrado concomitantemente com a SEB pela via intraplantar (Figura 2A). Entretanto, o extravasamento de proteínas não foi modificado por quaisquer das doses intraplantares de L-NAME utilizadas (Figura 2B).

### **3.2 - Efeito da administração endovenosa ou intraplantar do D-NAME sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB**

O D-NAME, enântiômero inativo, não alterou o processo inflamatório causado pela toxina, quando administrado quer pela via endovenosa (28 mg/kg) quer pela via intraplantar (0,28 mg/pata) (Tabela 1)



**Figura 1 - Efeito da administração endovenosa do L-NAME sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB.** O L-NAME, nas doses indicadas acima, foi injetado concomitantemente com o azul de Evans (25 mg/kg) imediatamente antes do estímulo. Animais Controle receberam apenas o azul de Evans. A SEB (25  $\mu$ g/pata) foi administrada intraplantarmente na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. O edema e a exsudação do azul de Evans foram medidos 4 h após a injeção da toxina. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \*P < 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).



**Figura 2 - Efeito da administração intraplantar do L-NAME sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB.** O L-NAME, nas doses indicadas acima, foi injetado pela via intraplantar, concomitantemente com a SEB (25  $\mu\text{g}$ /pata) na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. Animais Controle receberam apenas a SEB na pata esquerda. O azul de Evans (25 mg/kg) foi administrado endovenosamente, imediatamente antes do estímulo. O edema e a exsudação do azul de Evans foram medidos 4 h após a injeção da toxina. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

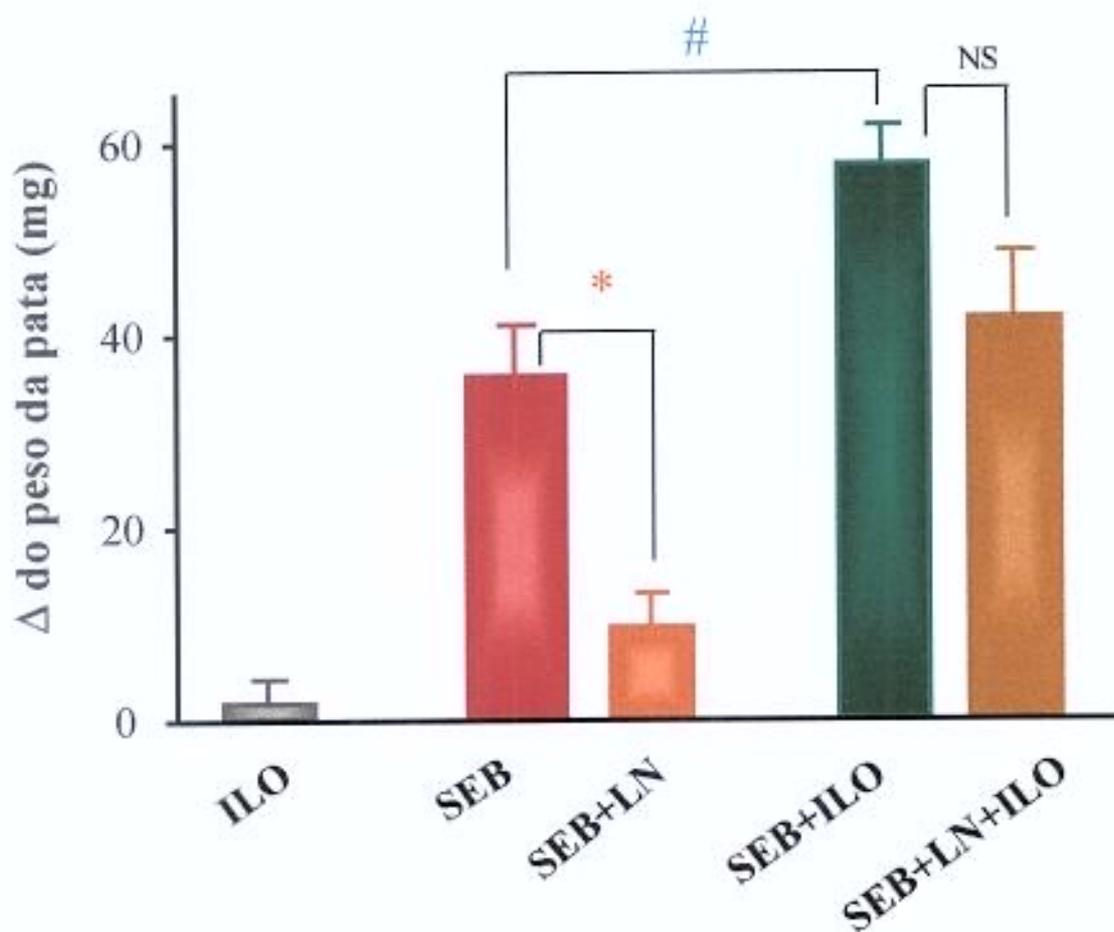
**Tabela 1 - Efeito da administração do D-NAME sobre o edema de pata e exsudação do azul de Evans induzidos pela SEB.**

<b>Tratamentos</b>	<b><math>\Delta</math> do peso da pata (mg)</b>	<b>azul de Evans (<math>\mu</math>g/g de tecido)</b>
Controle	$36 \pm 2,5$	$5,1 \pm 0,3$
D-NAME 28 mg/kg, i.v.	$32 \pm 3,7$	$5,5 \pm 0,6$
D-NAME 0,28 mg/pata	$30 \pm 3,2$	$4,9 \pm 0,9$

O D-NAME foi injetado concomitante com a SEB ou endovenosamente, juntamente com o azul de Evans (25 mg/kg), imediatamente antes do estímulo. A SEB (25  $\mu$ g/pata) foi administrada intraplantarmente, na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. O edema e a exsudação do azul de Evans foram medidos 4 h após a injeção da toxina. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n=5).

### **3.3 - Efeito do Iloprost sobre a inibição causada pela administração endovenosa do L-NAME na resposta edematogênica induzida pela SEB**

A figura 3 mostra que o Iloprost (0,3 nmol/pata), administrado pela via intraplantar, 1 h antes da medida do edema foi capaz de aumentar em 60% a resposta edematogênica induzida pela SEB. O iloprost, nesta mesma dose, reverteu a inibição (70%) causada pelo pré-tratamento com L-NAME (28 mg/kg) no edema de pata produzido pela SEB. O iloprost, administrado individualmente, não produziu edema significativo (Figura 3).



**Figura 3 - Efeito do iloprost sobre a inibição produzida pelo L-NAME no edema de pata induzido pela SEB.** O L-NAME (28 mg/kg; LN) foi injetado concomitantemente com o azul de Evans (25 mg/kg) imediatamente antes do estímulo. A SEB (25 µg/pata) foi administrada intraplantarmente na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. O iloprost (0,3 nmol/pata; ILO) foi administrado 1 h antes da medida do edema. O edema foi avaliado 4 h após a injeção da toxina. As barras expressam a média ± EPM (n=5). \*P< 0,05 SEB+LN em relação ao grupo SEB; #P< 0,05 SEB+ILO em relação ao grupo SEB; NS=não significativo (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

### **3.4 - Efeito da aminoguanidina sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB**

#### **3.4.1 - Administração endovenosa**

Nos dados ilustrados na figura 4A podemos observar que as doses de 50 e 75 mg/kg de aminoguanidina foram capazes de inibir significativamente o edema de pata e a exsudação do azul de Evans induzidos pela SEB (Figura 4B).

#### **3.4.2 - Administração intraplantar**

Quando a aminoguanidina (0,1-0,5 mg/pata) foi administrada pela via intraplantar, somente as doses de 0,25 e 0,5 mg/pata foram eficientes em inibir o edema de pata induzido pela SEB (Figura 5A). No entanto, a exsudação plasmática produzida pela toxina não foi alterada significativamente com a injeção local deste inibidor (Figura 5B).

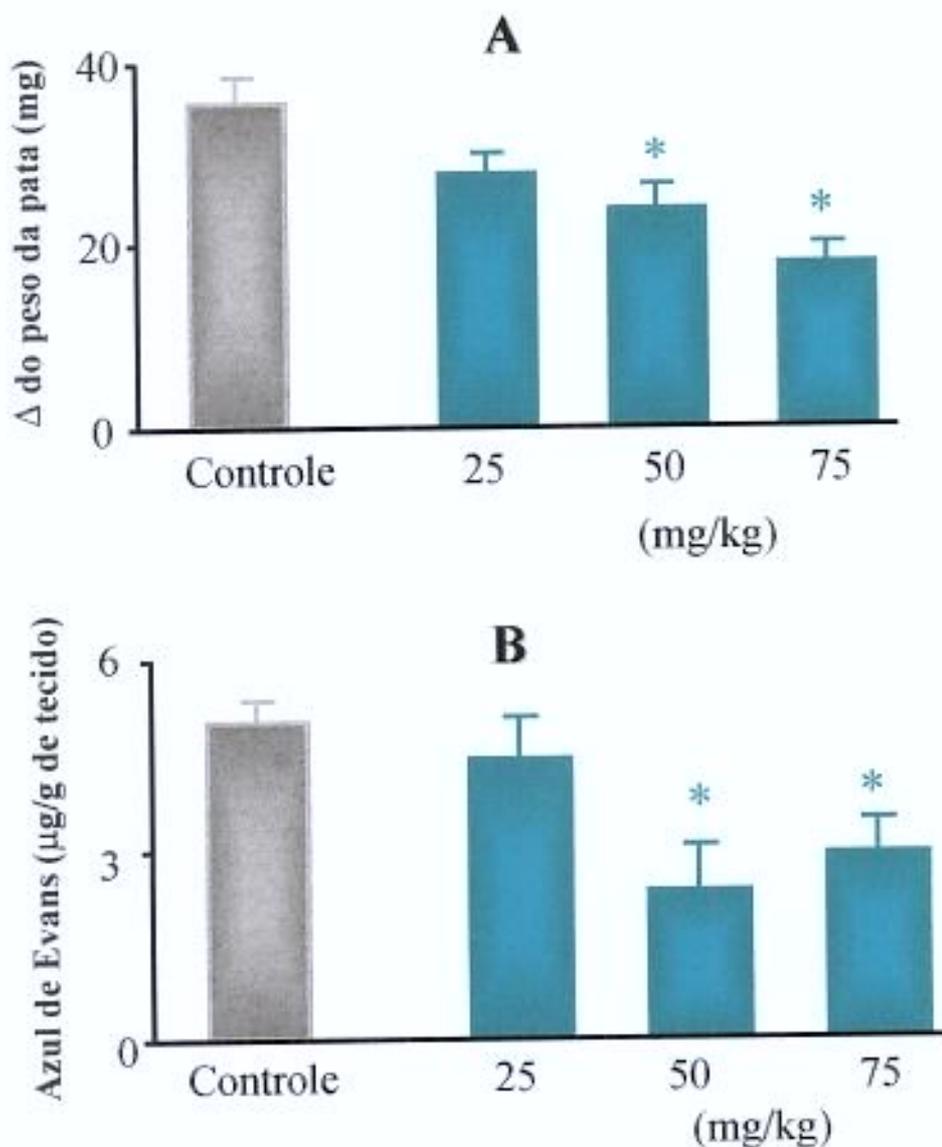
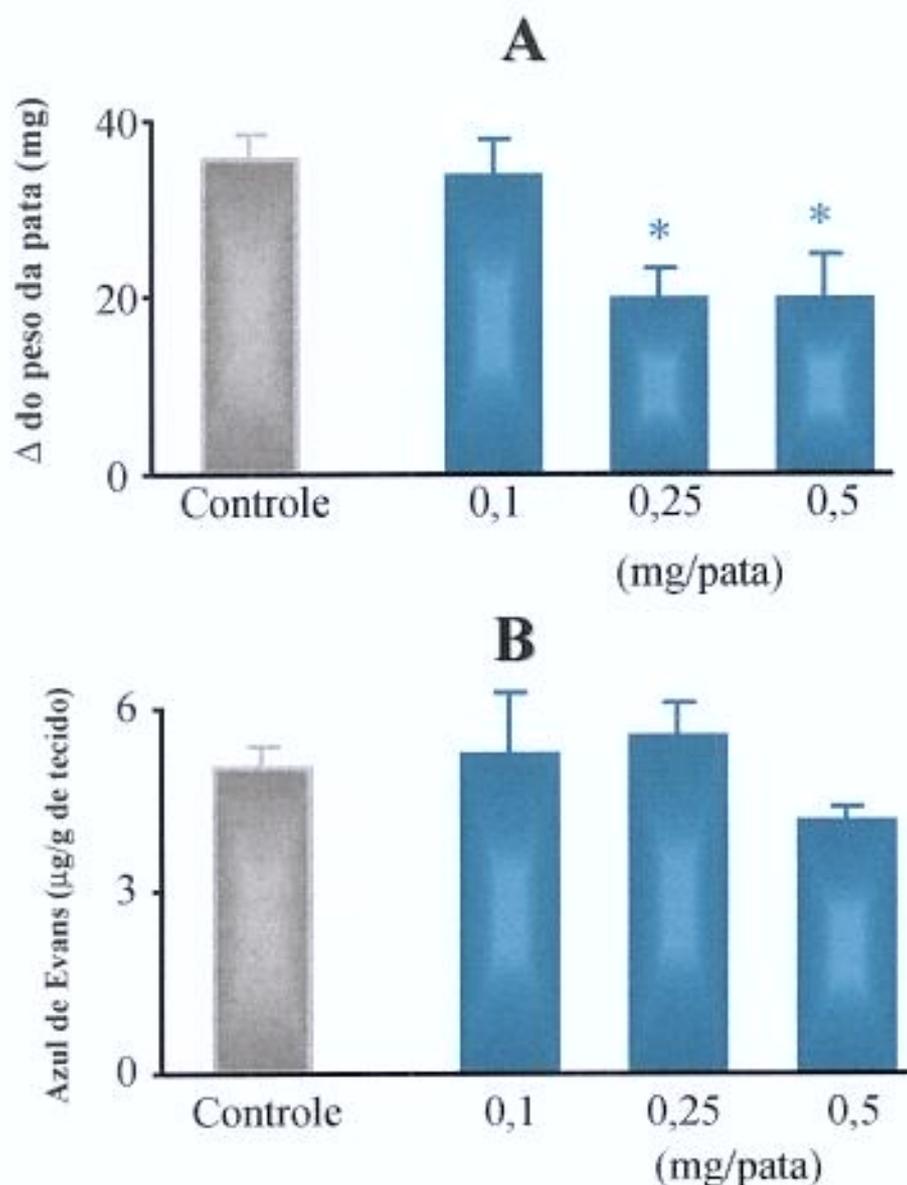


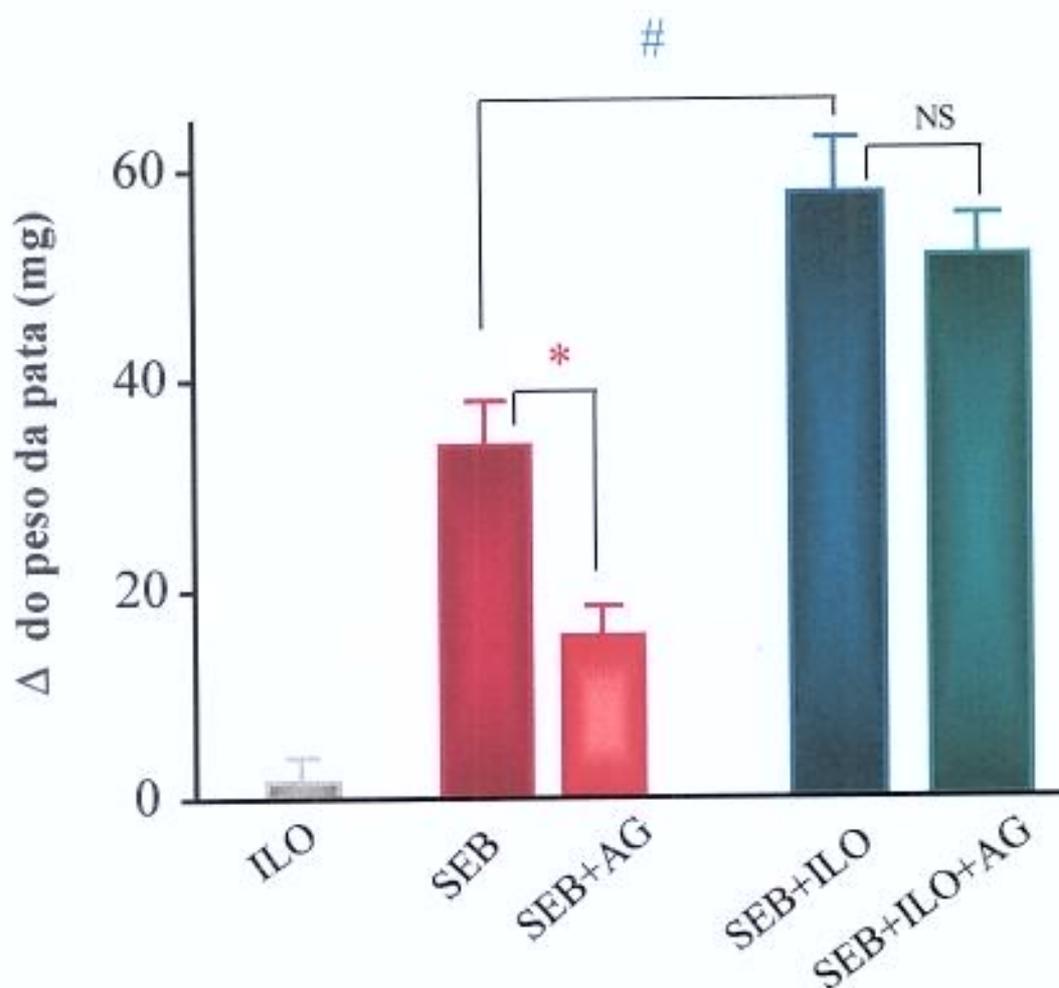
Figura 4 - Efeito da administração endovenosa da aminoguanidina sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB. A aminoguanidina, nas doses indicadas acima, foi injetada endovenosamente concomitantemente com o azul de Evans (25 mg/kg), imediatamente antes do estímulo. Animais Controle receberam apenas o azul de Evans. A SEB (25  $\mu\text{g/pata}$ ) foi administrada intraplantarmente na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. O edema e a exsudação do azul de Evans foram medidos 4 h após a injeção da toxina. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).



**Figura 5 - Efeito da administração intraplantar da aminoguanidina sobre o edema de pata (A) e exsudação do azul de Evans (B) induzidos pela SEB.** A aminoguanidina, nas doses indicadas acima, foi injetada pela via intraplantar concomitantemente com a SEB (25  $\mu\text{g/pata}$ ) na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. Animais Controle receberam apenas a SEB na pata esquerda. O azul de Evans (25 mg/kg) foi administrado endovenosamente imediatamente antes do estímulo. O edema (A) e a exsudação do azul de Evans foram medidos 4 h após a injeção da toxina. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \*P < 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

### **3.5 - Efeito do Iloprost sobre a inibição causada pela administração endovenosa da aminoguanidina na resposta edematogênica induzida pela SEB**

De modo semelhante ao L-NAME, o iloprost (0,3 nmol/pata), foi capaz de reverter completamente a inibição produzida pela administração endovenosa da aminoguanidina na dose de 75mg/kg (Figura 6).



**Figura 6 - Efeito do iloprost sobre a inibição produzida pela aminoguanidina no edema de pata induzido pela SEB.** A aminoguanidina (75 mg/kg; AG) foi injetada concomitantemente com o azul de Evans (25 mg/kg) imediatamente antes do estímulo. A SEB (25 µg/pata) foi administrada intraplantarmente na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. O iloprost (0,3 nmol/pata; ILO) foi administrado 1 h antes da medida do edema. O edema foi avaliado 4 h após a injeção da toxina. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \*P < 0,05 SEB+AG em relação SEB; #P < 0,05 SEB+ILO em relação ao grupo SEB; NS=não significativo (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

### **3.6 - Efeito da administração intraperitoneal do 7-nitroindazol sobre a resposta edematogênica induzida pela SEB**

Nos dados ilustrados na Tabela 2, podemos observar que o 7-nitroindazol (5-15 mg/kg), inibidor preferencial para nNOS, quando administrado pela via intraperitoneal, não foi capaz de alterar a resposta inflamatória induzida pela toxina.

O 6-aminoindazol (15 mg/kg), substância estruturalmente semelhante ao 7-nitroindazol, porém sem efeito inibitório sobre a NOS, também não modificou o edema e a exsudação plasmática produzidos pela SEB (Tabela 2).

**Tabela 2 - Efeito da administração intraperitoneal do 7-nitroindazol sobre o edema de pata e exsudação do azul de Evans induzidos pela SEB.**

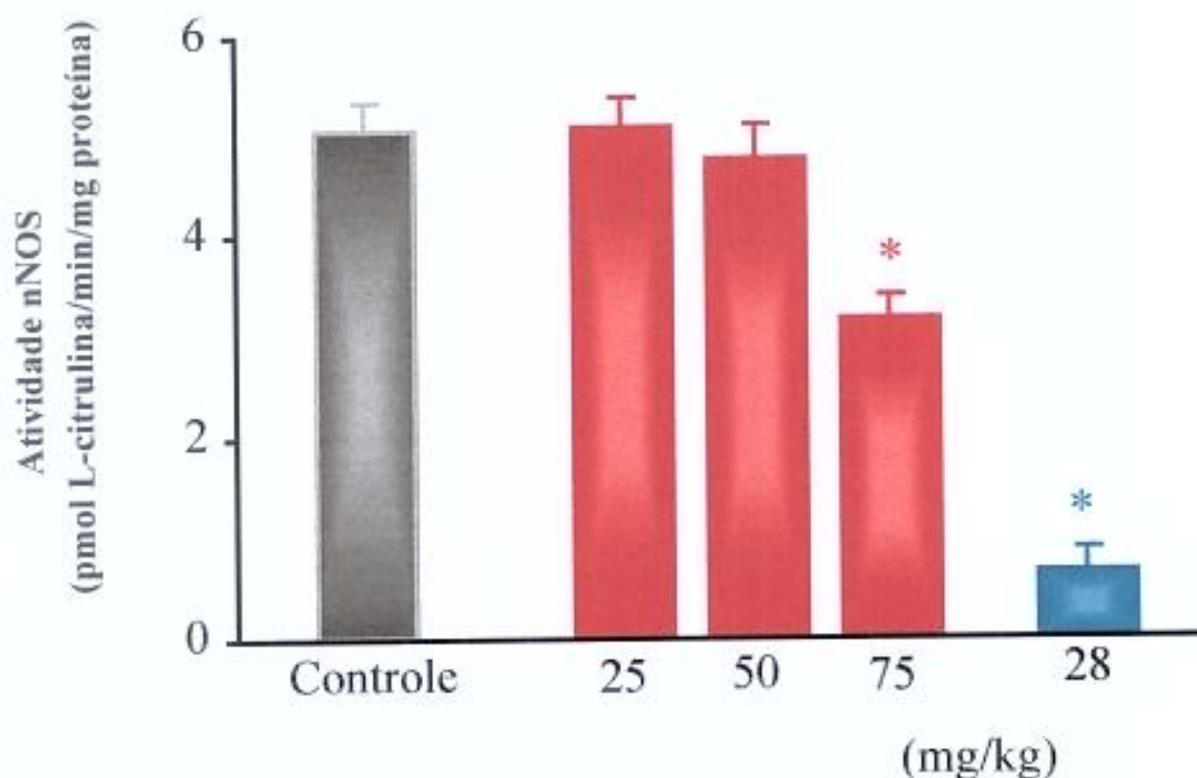
<b>Tratamentos</b>	<b><math>\Delta</math> do peso da pata (mg)</b>	<b>azul de Evans (<math>\mu</math>g/g de tecido)</b>
Controle	36 $\pm$ 2,5	5,1 $\pm$ 0,3
7-NI (mg/kg)		
5	34 $\pm$ 4,0	4,9 $\pm$ 0,8
10	34 $\pm$ 4,0	5,8 $\pm$ 0,7
15	30 $\pm$ 4,5	5,5 $\pm$ 1,2
6-aminoindazol		
15 mg/kg	30 $\pm$ 4,5	5,8 $\pm$ 1,6

O 7-nitroindazol (7-NI) ou o 6-aminoindazol, nas doses descritas acima, foram injetados pela via intraperitoneal, 0,5 h antes do estímulo. Os animais Controle receberam, nas mesmas condições, veículo. O azul de Evans (25 mg/kg) foi administrado endovenosamente, imediatamente antes da toxina. A SEB (25  $\mu$ g/pata) foi administrada intraplantarmente, na pata esquerda. A pata direita recebeu, nas mesmas condições, salina 0,9%. O edema e a exsudação do azul de Evans foram medidos 4 h após a injeção da toxina. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n=5).

### 3.7 – Efeito da aminoguanidina, L-NAME e 7-nitroindazol sobre a atividade da nNOS

Na figura 7 estão ilustrados os dados referentes à aminoguanidina e L-NAME. Esta figura mostra que apenas na maior dose de aminoguanidina (75 mg/kg) houve inibição significativa (36,5%;  $p < 0,05$ ) da atividade da enzima. O L-NAME, na dose de 28 mg/kg, inibiu a atividade da nNOS em 86%.

Em relação ao 7-nitroindazol, nenhuma das doses utilizadas, quando administradas 4,5 h antes da medida enzimática, foram capazes de inibir a atividade da nNOS. Por outro lado, quando este inibidor, na dose de 15 mg/kg, foi administrado 0,5 h antes, observamos inibição de 35 % na atividade desta enzima (Tabela 3).



**Figura 7 - Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre a atividade da nNOS.** Os animais receberam L-NAME (■) ou aminoguanidina (■) pela via endovenosa, nas doses indicadas acima. Animais Controle receberam pela mesma via, salina 0,9%. A medida da atividade da nNOS do cérebro foi realizada 4 h após a administração dos inibidores. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=4). \*P< 0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

**Tabela 3 - Efeito do 7-nitroindazol sobre a atividade da nNOS.**

Tratamentos	Atividade nNOS (pmol L-citrulina/min/mg proteína)
Controle	5,09 ± 0,25
7-NI (mg/kg) 4,5 h	
5	4,65 ± 0,36
10	4,70 ± 0,27
15	4,70 ± 0,38
7-NI (mg/kg) 0,5 h	
15	3,30 ± 0,22*

Os animais receberam 7-nitroindazol (7-NI), nas doses descritas acima, 4,5 h ou 0,5 h antes da medida da atividade da nNOS. Os dados estão representados como média ± EPM (n=4) em relação ao grupo que recebeu o veículo - Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA). \*P<0,05 em relação ao grupo controle.

### 3.8 - Efeito dos inibidores da NOS sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB na cavidade peritoneal

#### 3.8.1. - Efeito administração endovenosa de L-NAME e D-NAME

##### *Cavidades com número de macrófagos normais*

O L-NAME, nas doses de 14, 28 e 56 mg/kg, foi capaz de inibir significativamente a migração de neutrófilos induzida pela SEB nessas cavidades (Figura 8A, Tabela 5). A inibição foi, respectivamente, de 72%, 62% e 54%, mostrando assim que a mesma não obedece um padrão dose-resposta.

##### *Cavidades com número de macrófagos aumentados*

O número de macrófagos nas cavidades previamente estimuladas com 3% de Tg ( $36 \pm 3,1 \times 10^5$  macrófagos/cavidade) foi cerca de 8 vezes maior do que aquele encontrado em cavidades não estimuladas ( $4,4 \pm 0,6 \times 10^5$  macrófagos/cavidade).

Na figura 8 (painel B) mostramos que, em cavidades onde o número de macrófagos residentes está aumentado, o L-NAME (14, 28 e 56 mg/kg) reduziu significativamente o número absoluto de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal (33%, 29% e 35%, respectivamente), porém esta redução foi significativamente menor do que aquela observada em cavidades não estimuladas. O número relativo (%) de neutrófilos não foi alterado (Tabela 5).

O enantiômero inativo D-NAME (28 mg/kg) não alterou de maneira significativa a migração de neutrófilos induzida pela SEB, tanto em cavidades

não estimuladas ( $10,7 \pm 1,0$  e  $8,8 \pm 1,2 \times 10^5$  neutrófilos/cavidade para animais controle e tratados com D-NAME, respectivamente) como estimuladas com TG ( $18 \pm 0,8$  e  $16 \pm 1,7 \times 10^5$  neutrófilos/cavidade para animais controle e tratados com D-NAME, respectivamente). O número relativo (%) de neutrófilos também não foi modificado pelo D-NAME (Tabela 5).

### **3.8.2. - Efeito da administração local do L-NAME e D-NAME**

O estudo da administração local de L-NAME e D-NAME sobre o influxo de neutrófilos induzidos pela SEB foi realizado em cavidades não estimuladas. Nossos resultados mostraram que o L-NAME (1,4 e 2,8 mg/cavidade), quando co-injetado com a SEB (125  $\mu$ g/cavidade), inibiu significativamente (62,4%) a migração de neutrófilos induzida pela toxina na cavidade peritoneal de camundongos. A injeção concomitante de D-NAME (2,8 mg/cavidade) não alterou de maneira significativa o influxo de neutrófilos induzido pela SEB nesta cavidade (Tabela 4).

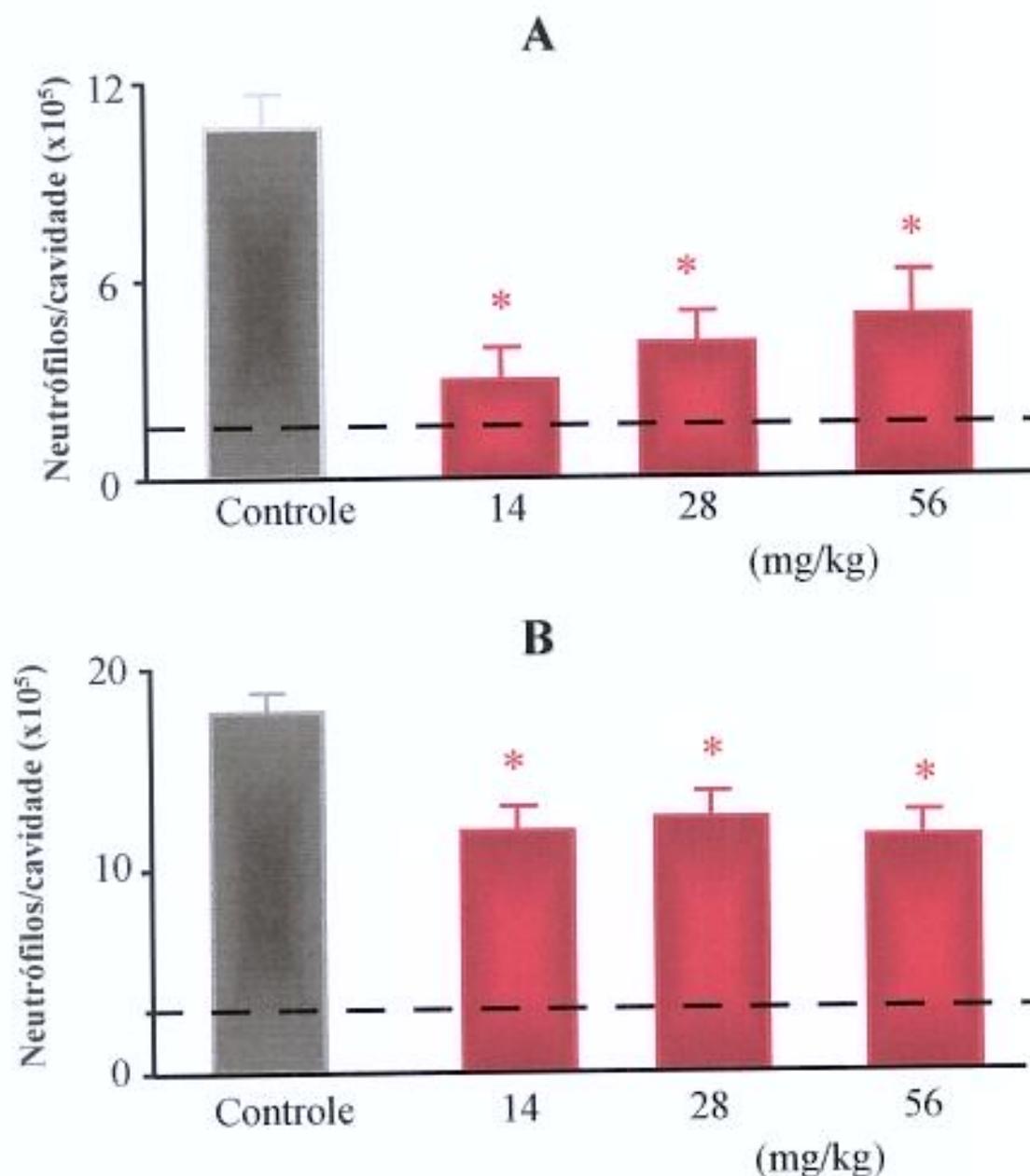


Figura 8 - Efeito do L-NAME sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB em cavidades com o número de macrófagos normais (A) ou aumentados (B). O L-NAME, nas doses indicadas acima, foi administrado imediatamente antes da injeção da SEB (125  $\mu\text{g}$ /cavidade). O Tg à 3% (2 ml/cavidade, i.p.) foi injetado 4 dias antes do experimento. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após o estímulo lesivo. A linha tracejada representa a migração de neutrófilos induzida pela toxina PBS estéril. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \*P < 0,05 em relação aos grupos Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

**Tabela 4 - Efeito da administração local do L-NAME e D-NAME sobre o influxo de neutrófilos e leucócitos mononucleares/mastócitos induzido pela SEB.**

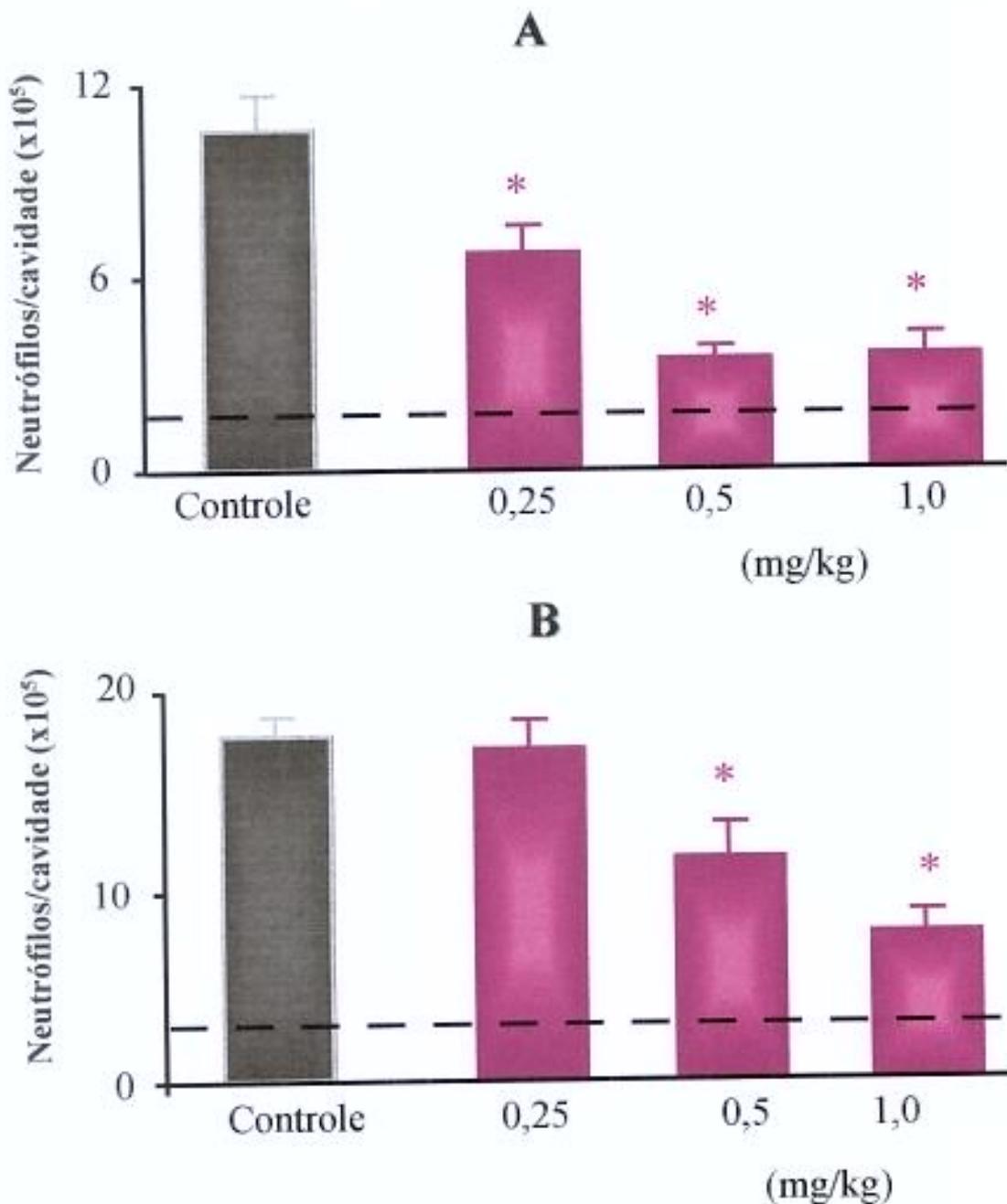
Tratamentos	Neutrófilos		Mono/mastócito	
	x10 <sup>5</sup> /cavidade	%	x10 <sup>5</sup> /cavidade	%
Controle	8,5 ± 1,8	17,4	38,9 ± 5,3	82,6
L-NAME				
1,4	3,2 ± 0,1*	11,8 *	24,1 ± 0,3	89,2
2,8	3,2 ± 0,4*	10,2 *	28,2 ± 2,3	80,8
D-NAME				
2,8	7,8 ± 0,6	21,6	28,3 ± 2,0	78,4

Os animais receberam L-NAME ou D-NAME (mg/cavidade) concomitantemente com a SEB (125 µg/cavidade) pela via intraperitoneal. O número de neutrófilos foi determinado 12 h após a injeção da toxina. Os dados estão representados como média ± EPM (n=5). \*P<0,05 em relação ao grupo Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

### 3.8.3 - Efeito da dexametasona

Em cavidades com número de macrófagos normais, a dexametasona, administrada pela via subcutânea nas doses de 0,25, 0,5 e 1 mg/kg (1 h antes), promoveu inibição significativa no influxo de neutrófilos induzido pela SEB (Figura 9A, Tabela 5). A inibição foi de 36%, 67% e 66% , respectivamente.

Em cavidades com número de macrófagos aumentados, a dexametasona causou redução significativa do número absoluto de neutrófilos nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg (35% e 56%, respectivamente; Figura 9B). Quando consideramos a quantidade relativa de células (%), apenas a dose de 1 mg/kg causou inibição significativa (Tabela 5).

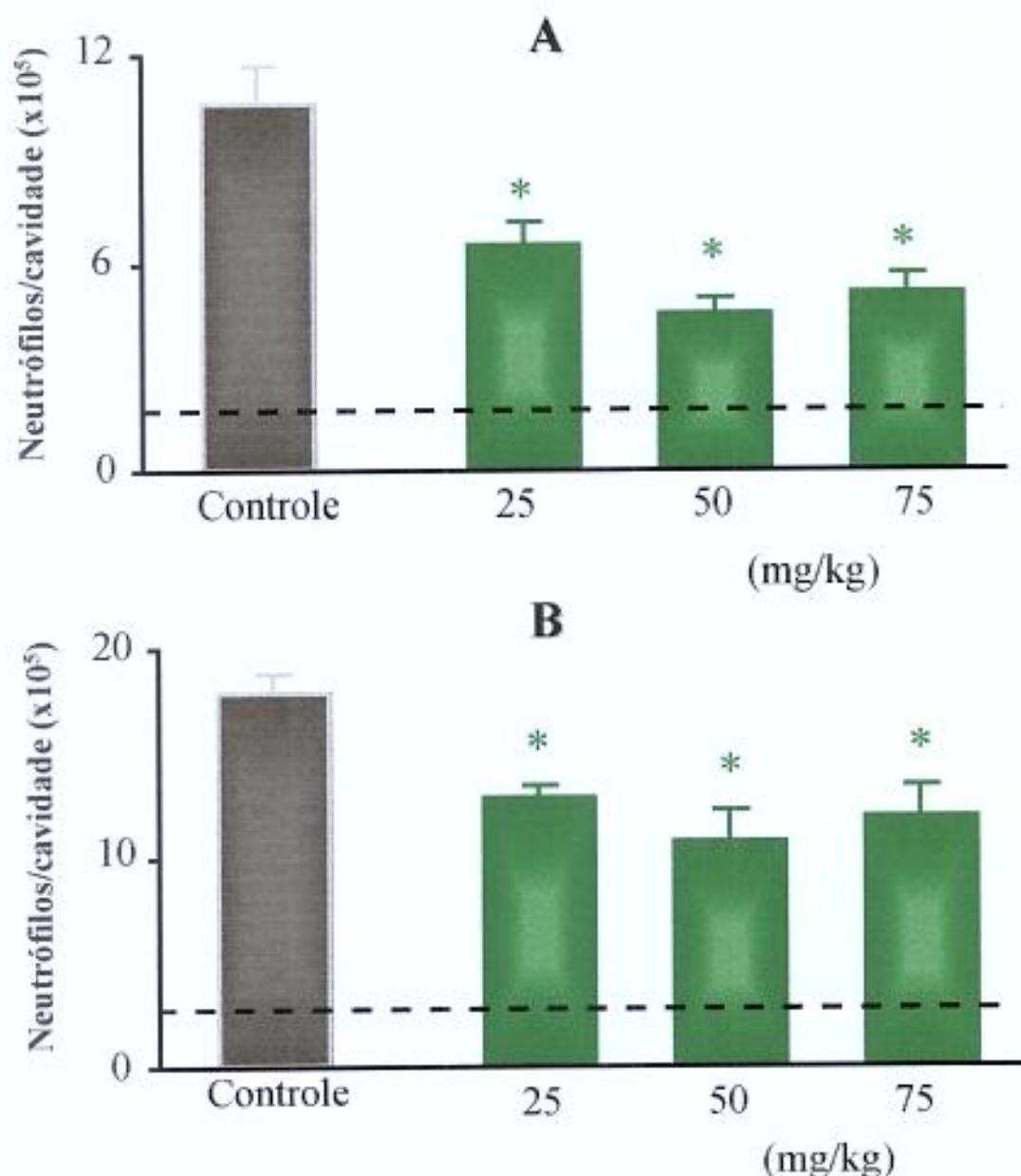


**Figura 9 - Efeito da dexametasona sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB em cavidades com o número de macrófagos normais (A) ou aumentados (B).** A dexametasona, nas doses indicadas acima, foi administrada subcutaneamente 1 h antes da injeção da SEB (125  $\mu$ g/cavidade). O Tg à 3% (2 ml/cavidade, i.p.) foi injetado 4 dias antes do experimento. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após o estímulo lesivo. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam ao invés da toxina PBS estéril. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=5). \*P<0,05 em relação aos grupos Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

### 3.8.4 - Efeito da aminoguanidina

Em cavidades com número de macrófagos normais, a administração da aminoguanidina (25, 50 ou 75 mg/kg) reduziu significativamente a migração de neutrófilos induzida pela SEB (Figura 10A, Tabela 5). A inibição foi de 38%, 57% e 51%, respectivamente.

Em cavidades com número de macrófagos aumentados, a aminoguanidina, nestas mesmas doses, reduziu significativamente o influxo de neutrófilos induzido pela toxina quando consideramos o número absoluto de células (28%, 40% e 33%, respectivamente; Figura 10B). Em termos percentuais, não verificamos redução significativo do número de neutrófilos nos animais tratados com aminoguanidina (Tabela 5).



**Figura 10 - Efeito da aminoguanidina sobre a migração de neutrófilos induzida pela SEB em cavidades com o número de macrófagos normais (A) ou aumentados (B).** A aminoguanidina, nas doses indicadas acima, foi administrada imediatamente antes da injeção da SEB (125  $\mu$ g/cavidade). O Tg à 3% (2 ml/cavidade, i.p.) foi injetado 4 dias antes do experimento. A migração de neutrófilos foi avaliada 12 h após o estímulo lesivo. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam ao invés da toxina PBS estéril. As barras expressam a média  $\pm$  EPM de (n=5). \*P < 0,05 em relação aos grupos Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

### **3.9 - Efeito dos inibidores da NOS (L-NAME e aminoguanidina) e da dexametasona sobre o números de leucócitos mononucleares.**

O número de células mononucleares nos diversos grupos experimentais está mostrado na Tabela 5. O exame da tabela mostra que o número obtido de células em cavidades não-estimuladas (-Tg) está, de modo geral, elevado nos animais tratados com L-NAME, aminoguanidina e dexametasona em relação aos animais controle (injetados com salina). Em cavidades estimuladas com Tg (+Tg), o número de células mononucleares não foi modificado em relação aos animais controle, exceto para o tratamento com dexametosa na dose de 1 mg/kg (Tabela 5).

**Tabela 5 - Efeito da administração sistêmica dos inibidores da óxido nítrico sintase (L-NAME e aminoguanidina) e da dexametasona sobre o número de neutrófilos, leucócitos mononucleares/mastócitos em cavidades sem pré-tratamento (-Tg) ou pré-tratadas com tioglicolato (+Tg).**

	%			
	Neutrófilos		MONO/mastócito	
	- Tg	+ Tg	- Tg	+ Tg
PBS	3,00	4,40	97,0	95,6
SEB	29,8	29,8	70,2	70,2
LN 14	10,6*	22,4	89,4*	76,6
LN 28	10,6*	25,3	89,4*	74,8
LN 56	13,2*	29,4	86,8*	70,6
DN 28	23,4	24,3	76,6	75,8
DEX 0,25	19,2*	32,6	80,8*	67,4
DEX 0,50	12,0*	25,8	88,0*	74,2
DEX 1,00	12,8*	19,0*	87,2*	81,0*
AG 25	22,4*	30,8	77,6*	69,2
AG 50	15,8*	25,0	84,2*	75,0
AG 75	16,6*	25,5	83,4*	74,5

Os animais receberam L-NAME (mg/kg; LN) ou aminoguanidina (mg/kg; AG) pela via endovenosa imediatamente antes da SEB (125 µg/cavidade); a dexametasona (mg/kg; DEX) foi injetada subcutaneamente 1 h antes da toxina. A migração foi avaliada 12 h após a injeção intraperitoneal da SEB. Os dados estão representados como média (n=5) \*P<0,05 em relação ao grupo SEB (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).

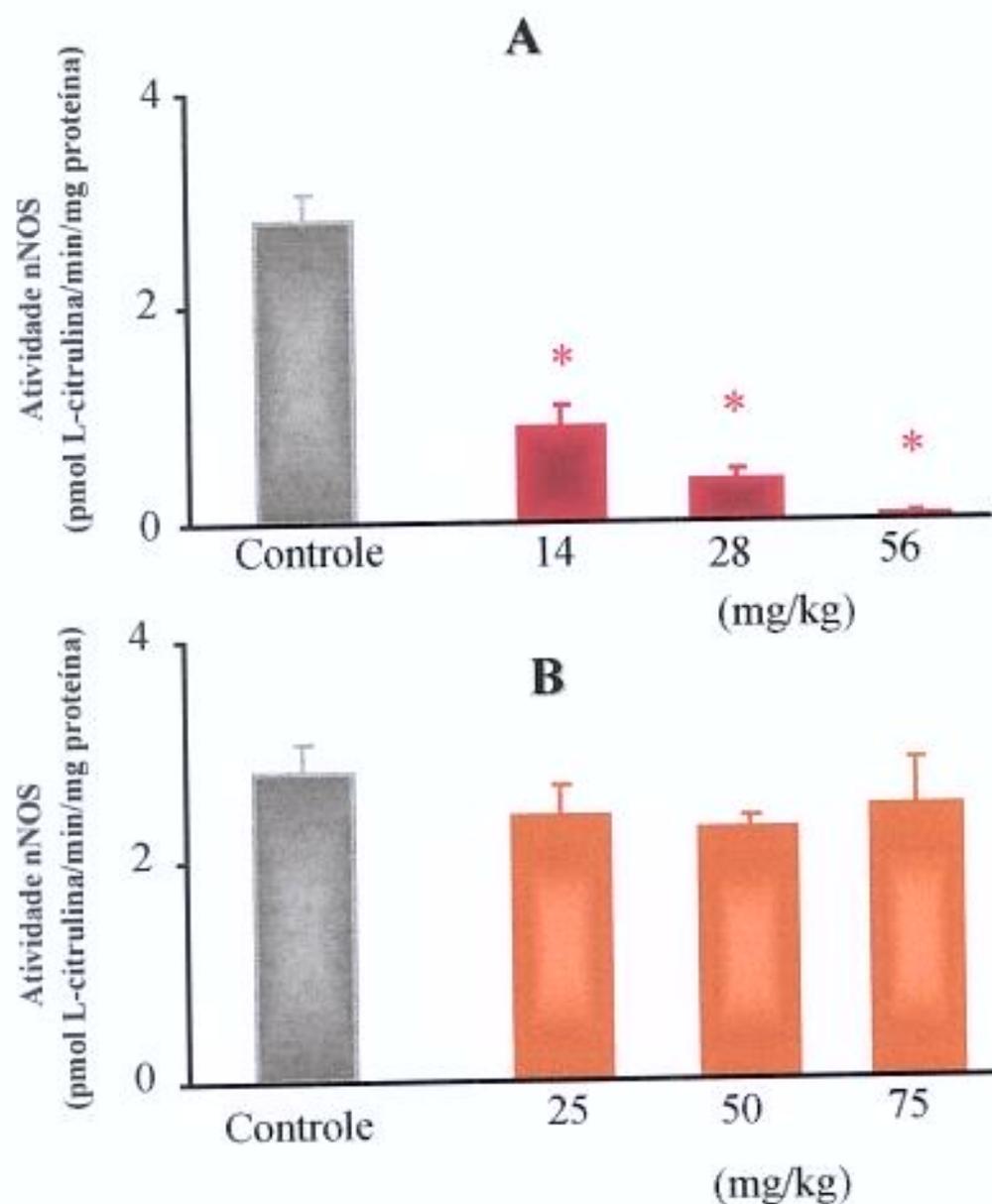
### 3.10 – Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre a atividade da NOS.

#### *Efeito sobre a nNOS*

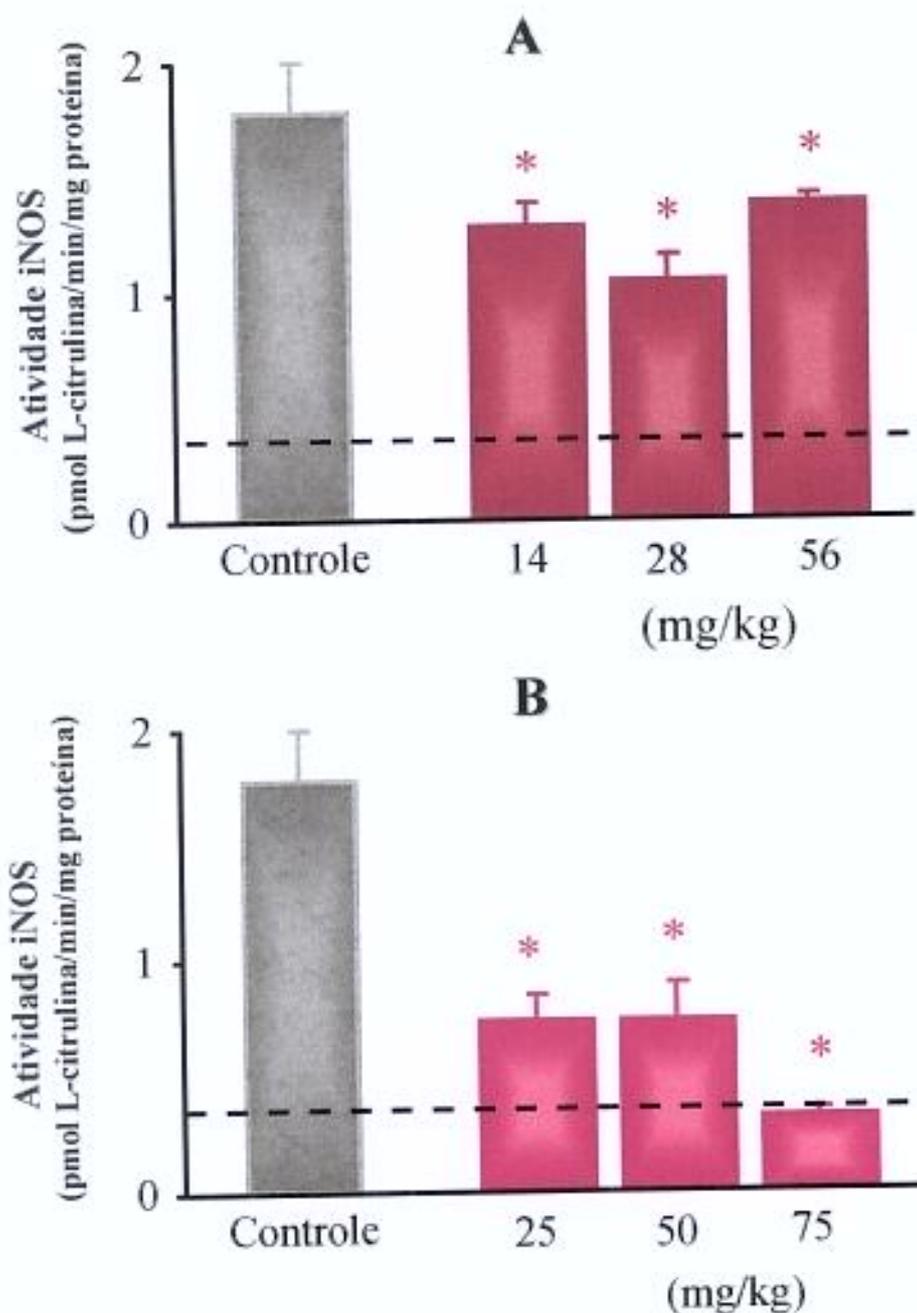
A figura 11 mostra que a administração prévia (12 h) de L-NAME (14-56 mg/kg), inibiu de maneira dose-dependente a atividade da nNOS do cérebro (Painel A). A aminoguanidina (25-75 mg/kg, 12 h), nas mesmas condições, foi incapaz de afetar a atividade desta enzima (Figura 11B).

#### *Efeito sobre a iNOS*

Esta figura mostra que tanto o L-NAME (14-56 mg/kg) como a aminoguanidina (25-75 mg/kg) foram capazes de inibir significativamente a atividade da iNOS de pulmão (Figura 12A e B).



**Figura 11 - Efeito do L-NAME (A) e da aminoguanidina (B) sobre a atividade da nNOS.** O L-NAME e a aminoguanidina, nas doses indicadas acima, foram administrados pela via endovenosa, 12 h antes da medida da atividade da nNOS do cérebro. Animais Controle receberam, pela mesma via, salina 0,9%. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=4). \*P < 0,05 em relação aos grupos Controle (teste de Bonferroni precedido de ANOVA).



**Figura 12 - Efeito do L-NAME (A) e da aminoguanidina (B) sobre a atividade da iNOS.** O L-NAME e a aminoguanidina, nas doses indicadas acima, foram administrados concomitantemente com o LPS (10 mg/kg) pela via endovenosa 12 h antes da medida da atividade da iNOS do pulmão. A linha tracejada representa a média dos grupos que receberam ao invés do LPS, salina 0,9 %. As barras expressam a média  $\pm$  EPM (n=4). \*P < 0,05 em relação ao grupo recebeu apenas o LPS (Controle; teste de Bonferoni precedido de ANOVA).

## ***4. DISCUSSÃO***

## Eventos vasculares

Nossos resultados demonstraram que o L-NAME, quando administrado pelas vias endovenosa e intraplantar, foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela SEB em camundongos, sugerindo que o NO modula o aumento da permeabilidade vascular. O fato do D-NAME, enântiômero inativo, não ter produzido efeito inibitório no edema e na exsudação plasmática induzido pela toxina, mostra que a redução da resposta edematogênica deve-se realmente à inibição da NOS.

O NO é um potente vasodilatador que, através de mudanças no fluxo sanguíneo local, pode regular o aumento da permeabilidade vascular e formação de edema (MONCADA *et al.*, 1991, MONCADA & HIGGS, 1993). Entretanto, o papel do NO na regulação da permeabilidade vascular ainda é bastante controverso. Trabalhos prévios também mostraram que a administração aguda de L-NAME reduz o extravasamento de plasma em pele de rato (HUGES *et al.*, 1990; IALENTI *et al.*, 1992), cobaia (TEIXEIRIA *et al.*, 1993) e coelho (MARIANI-PEDROSO *et al.*, 1995) e em pata de ratos (ANTUNES *et al.*, 1990, 1992; IALENTI *et al.*, 1992; GIRALDELO *et al.*, 1994). Estes autores acreditam que a diminuição do edema deve-se sobretudo à redução do fluxo sanguíneo por vasoconstrição local. De fato, substâncias puramente vasoconstritoras tais como catecolaminas (O'DUFFY & CHAHL, 1979) e endotelina (BRAIN *et al.*, 1989; CHANDER *et al.*, 1990) são capazes de reduzir o extravasamento de proteínas, pela diminuição da perfusão sanguínea local. Por outro lado, em bochecha de hamster, o L-NAME também reduz a permeabilidade vascular mas, nesse caso, os autores acreditam que a redução seja independente do fluxo sanguíneo local (MAYHAN, 1992).

O fato do tratamento com L-NAME inibir o edema sem afetar a quantidade de proteína extravasada parece sugerir que seu efeito decorre mesmo de redução do fluxo sanguíneo (“vasoconstrição”) pela remoção do NO gerado localmente na microcirculação cutânea. É possível que a redução de fluxo não seja tão grande a ponto de reduzir a saída de proteínas em vênulas pós-capilares, mas o suficiente para reduzir a pressão hidrostática no leito capilar. A pressão hidrostática juntamente com a pressão osmótica das proteínas no interstício, é fundamental para direcionar a saída de líquidos do leito capilar para o interstício gerando o edema inflamatório.

Assim, decidimos conduzir os experimentos com o iloprost, no sentido de averiguar se a redução do edema pelo L-NAME era, de fato, decorrente de “vasoconstrição local”. O iloprost é um análogo estável da prostaciclina, e, como tal, possui intensa ação vasodilatadora (SKUBALLA *et al.*, 1988) que poderia contrabalançar a redução de fluxo arteriolar produzida pelo L-NAME. Trabalho prévio mostrou que a administração local de iloprost reverteu a inibição causada pelo tratamento dos animais com L-NAME no edema de pata induzido pela carragenina, sugerindo aos autores que ação inibitória do L-NAME tinha um componente vasoconstritor importante (MEDEIROS *et al.*, 1995). Nossos resultados mostraram que, nos animais injetados com iloprost, houve reversão significativa da inibição do edema causada pelo tratamento com L-NAME; isto sugere, mais uma vez, que o efeito inibitório deste composto sobre o edema de pata (e extravasamento de proteínas) induzidos pela SEB é devido a redução de fluxo arteriolar local, sem afetar significativamente o aumento da permeabilidade vascular venular. Isto poderá ser confirmado futuramente medindo-se diretamente o fluxo local nas patas dos animais.

Entretanto, o que nos causou estranheza foi o fato da aminoguanidina também inibir significativamente a exsudação protéica e o edema induzidos pela SEB. A aminoguanidina tem sido bastante utilizada como inibidor seletivo de iNOS em vários sistemas biológicos (CORBETT *et al.*, 1992; MISKO *et al.*, 1993; CROSS *et al.*, 1994; SALVEMINI *et al.*, 1996; ROSE *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 1998), e, *a priori*, não deveria causar redução de fluxo sanguíneo local uma vez que o NO responsável pelo tônus vasodilatador é aquele oriundo da eNOS. Desta forma, trabalhamos com a hipótese que, nas doses utilizadas, a aminoguanidina estivesse inibindo significativamente a NOS endotelial. De fato, nossos resultados mostram que o iloprost reverteu completamente o efeito inibitório da aminoguanidina, sugerindo que o mecanismo de ação seja idêntico àquele do L-NAME. Assim, é possível que a aminoguanidina, em doses mais elevadas, perca a seletividade para a iNOS. Na dose de 75 mg/kg, a aminoguanidina inibiu significativamente a atividade da nNOS em cérebros de camundongos, reforçando que os efeitos principais deste composto no edema de pata tenham sido devido à inibição não seletiva da NOS. Trabalhos prévios mostraram que realmente a seletividade deste inibidor é um assunto controverso e pode depender da dose utilizada (SOUTHAN & SZABÓ, 1996). É interessante notar que a dose de 50 mg/kg de aminoguanidina inibiu o edema de pata, mas não afetou a atividade da nNOS; isto parece sugerir que a SEB possa também, direta ou indiretamente, induzir a iNOS, levando à produção de NO e este, por sua vez, modular o fluxo sanguíneo local e/ou a permeabilidade vascular.

Alguns autores sugerem que o NO envolvido na resposta edematogênica inicial (4 h) induzida pela carragenina, é produzido pela cNOS ao passo que o NO sintetizado em fases mais tardias (após 4 h) parece ser proveniente da

iNOS, sendo responsável pela manutenção desta resposta inflamatória (SALVEMINI *et al.*, 1996).

Um outro aspecto a ser discutido é a ausência de correlação entre as doses de L-NAME e aminoguanidina que causaram inibição do edema de pata e do extravasamento de proteínas, sendo a inibição deste último fenômeno vista apenas com as doses mais elevadas de ambos os compostos. Este resultado mostra que a quantidade de proteína extravasada é a mesma, porém o edema está reduzido. Embora a interpretação deste resultados não nos seja ainda clara, é possível que, nas doses menores de L-NAME e aminoguanidina, a vasoconstrição não seja tão grande a ponto de reduzir a saída de proteínas em vênulas pós-capilares, mas o suficiente para apenas reduzir a pressão hidrostática do leito capilar. Estudos prévios mostraram que o L-NAME é capaz de reduzir a pressão hidrostática (KUBES & GRANGER, 1992) e de causar inibição do edema sem afetar a cinética de permeabilidade (MEDEIROS *et al.*, 1995).

Em conjunto, os resultados de exsudação de proteínas e edema de pata induzidos pela SEB em camundongos, mostram que esses fenômenos são modulados pela formação de NO na microcirculação local, sendo o NO derivado de cNOS e/ou iNOS. Entretanto, estes resultados ainda não respondem o(s) mecanismo(s) pelo(s) quais a SEB induz a formação de edema. Não sabemos, por exemplo, se o aumento da permeabilidade vascular induzido pela SEB representa uma ação direta desta toxina nas células endoteliais das vênulas pós-capilares, ou se a mesma induz a formação de outros mediadores capazes de aumentar a permeabilidade (ação indireta). Nossos resultados aqui apresentados não respondem esta pergunta.

Estudos recentes mostram que o edema induzido pela SEB é parcialmente neurogênico, uma vez que é inibido pela capsaicina (DESOUZA *et al.*, 1996), substância que depleta os neurônios sensoriais do seu conteúdo de neuropeptídeos (FOREMAN, 1987). Isto sugere que a substância P, principal mediador peptídico da inflamação neurogênica, está envolvida neste fenômeno. Trabalhos prévios demonstraram que o NO endógeno modula a formação do edema induzido pela substância P e capsaicina (HUGHES *et al.*, 1990; HERBERT & HOLZER, 1994). Além disso, LIPPE *et al.* (1993) mostraram que a vasodilatação neurogênica, mas não a formação do edema, induzida pelo óleo de mostarda é inibida pelo L-NAME. Além disso, o NO de origem neuronal parece estar envolvido na vasodilatação neurogênica observada na pele de ratos após estimulação antidrômica dos nervos sensoriais (MERHI *et al.*, 1998). A utilização de inibidor mais seletivo para nNOS facilitaria a interpretação dos resultados. Recentemente, o 7-nitroindazol foi descrito como um inibidor mais seletivo da isoforma neuronal da NOS. Utilizando este inibidor, KAJEKAR *et al.* (1994) demonstraram que o NO está envolvido na liberação de neuropeptídeos dos neurônios sensoriais. Em nossos experimentos, este inibidor não alterou a resposta edematogênica induzida pela toxina; porém, não podemos descartar a hipótese que esta isoforma da NOS (nNOS) seja a responsável pela síntese do NO no foco inflamatório, uma vez que utilizamos doses baixas deste inibidor devido à difícil solubilidade do composto. MOORE *et al.* (1993) observaram inibição efetiva da nNOS em camundongos somente com doses superiores a 25 mg/kg.

Os experimentos da medida da atividade da nNOS em animais tratados com este inibidor, demonstraram que ação do 7-nitroindazol depende do tempo da administração, uma vez que, somente quando este inibidor foi injetado 0,5 h

antes da determinação da atividade enzimática observamos redução significativa na atividade da nNOS.

### **Eventos celulares**

Trabalhos anteriores mostram que a SEB induz migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos, sendo este fenômeno mediado por histamina, PAF, leucotrienos e neuropeptídeos (DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA, 1996). Neste trabalho procuramos avaliar o envolvimento do NO nesta resposta quimiotática.

Visto que o LPS e a SEB compartilham várias propriedades biológicas (BERGDOLL & CHESNEY, 1991), pensamos inicialmente que o influxo de neutrófilos induzido pela SEB era decorrente de contaminação das soluções com endotoxina bacteriana que, mesmo em pequenas doses, é capaz de induzir um acentuado influxo destas células (SMITH *et al.*, 1977). Para descartar tal possibilidade, incubamos soluções de LPS (ou SEB) com polimixina B, um antibiótico capaz de inativar o LPS presente na membrana das bactérias Gram-negativas (CUNHA & FERREIRA, 1986). Assim, mesmo após a incubação com polimixina, a SEB (mas não o LPS) induziu migração de neutrófilos, descartando que a migração tenha sido devida à contaminação com tais bactérias (dados não mostrados).

Citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 induzem a atividade da iNOS, tanto *in vitro* como *in vivo*, que resulta em aumento da formação de NO (SZABÓ & THIEMERMANN, 1995). Trabalho prévio demonstrou que a injeção intraperitoneal da SEB em camundongos, promove liberação de NO (avaliado pelos níveis de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>), com resposta máxima

16 h após a administração (FLORQUIM *et al.*, 1994). Essas informações em conjunto, nos levaram a pensar que a migração de neutrófilos induzida pela SEB é também modulada pelo NO.

O papel do NO no recrutamento de leucócitos não está plenamente esclarecido. Este mediador pode tanto desempenhar um papel pró-inflamatório, como antiinflamatório (CATTELL & JANSEN, 1995), dependendo do leito vascular investigado e, possivelmente, da espécie animal em estudo. Recentemente, VIANNA *et al.* (1998) demonstraram que a administração aguda de L-NAME inibe o influxo de neutrófilos induzido pela des-Arg<sup>9</sup>-BK, em modelo de pleurisia em camundongos, sugerindo uma participação efetiva do NO no influxo destas células. Por outro lado, o tratamento crônico de ratos com L-NAME não afeta o influxo de neutrófilos, quer em modelo de inflamação alérgica (FERREIRA *et al.*, 1998), quer em modelo de inflamação não-alérgica (MEDEIROS *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 1996).

Nossos dados mostram que os inibidores L-NAME e aminoguanidina, administrados agudamente, foram capazes de inibir o influxo de neutrófilos induzido pela SEB na cavidade peritoneal de camundongos, sugerindo que o NO, além de modular o aumento da permeabilidade vascular e edema, modula também o influxo destas células em resposta à SEB. A redução pelo L-NAME foi de fato devida à inibição da síntese do NO uma vez que o D-NAME não interferiu nesta resposta.

Embora a inibição causada pelo L-NAME possa ser decorrente de vasoconstrição da microcirculação mesentérica, não acreditamos nessa possibilidade, uma vez que, a aminoguanidina também causou inibição dose-dependente da quimiotaxia de neutrófilos. Nesse caso, os efeitos da aminoguanidina não foram devidos à inibição inespecífica da cNOS visto que a

mesma, 12 h após a administração intraperitoneal, não modificou a atividade da nNOS, mas foi capaz de inibir a atividade da iNOS. Além disso, a dose de 25 mg/kg de aminoguanidina que, segundo alguns autores, tem especificidade maior para iNOS (FERRAZ *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1998), produziu inibição semelhante àquela observada com as maiores doses deste inibidor, reforçando a hipótese que a isoforma induzível da NOS esteja envolvida na produção do NO no foco inflamatório

Estes dados sugerem que a injeção intraperitoneal da SEB promove formação tardia de NO por ativação de iNOS, sendo este mediador importante para a migração de neutrófilos induzida por esta toxina. Isto é reforçado pelos dados mostrando que a dexametasona (inibidor da indução da iNOS) também reduziu significativamente a quimiotaxia de neutrófilos induzida pela SEB. Obviamente, como a dexametasona também inibe liberação de TNF e IL-1 (BEUTLER *et al.*, 1986; STARUCH & WOOD, 1985), citocinas essas possivelmente implicadas na quimiotaxia de neutrófilos pela SEB, não podemos assegurar que os efeitos inibitórios da dexametasona sejam unicamente devidos à inibição da iNOS.

Sabe-se que os macrófagos residentes participam intensamente do desenvolvimento de vários eventos descritos como fase aguda da inflamação. Estas células são responsáveis pela iniciação da mobilização de neutrófilos da circulação para as regiões de danos tissulares. Trabalhos de DESOUZA & RIBEIRO-DASILVA (1996) mostraram que a migração de neutrófilos induzida pela SEB é dependente do número de macrófagos. Além disso, a administração sistêmica de SEB em camundongos promove a liberação de uma variedade de citocinas incluindo o TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2 e IL-6 (MIETHKE *et al.*, 1992; GONZALO *et al.*, 1994).

Experimentos com cavidades tratadas com tioglicolato (agente capaz de induzir inflamação por elicitar macrófagos e neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos e ratos; GALLILY *et al.*, 1964) foram também conduzidos para compreendermos melhor a correlação entre macrófagos, indução de iNOS e quimiotaxia *in vivo* de neutrófilos induzida pela SEB. Nossos resultados mostraram que o tioglicolato determinou um aumento significativo no conteúdo de macrófagos peritoneais. Nesta situação, a injeção intraperitoneal de SEB causou um aumento de cerca de 2 vezes do número absoluto de neutrófilos. Curiosamente, esta diferença não foi observada com os dados percentuais. O tratamento dos animais com L-NAME, aminoguanidina ou dexametasona também reduziu significativamente o número absoluto de neutrófilos em resposta à SEB. Mais uma vez, quando analisamos os dados relativos (%) de conteúdo celular, notamos que, de modo geral, estes inibidores não interferiram com o influxo de neutrófilos. Nossos resultados não nos permitem ainda explicar as discrepâncias quanto à cavidade estimulada e não-estimulada no que refere-se aos valores absolutos e relativos de migração de neutrófilos nos animais tratados com os diferentes inibidores. De qualquer forma, quando considerarmos os números absolutos de influxo celular, notamos que a inibição produzida pelo L-NAME no influxo de neutrófilos pela SEB em cavidades estimuladas pelo Tg foi menor do que em cavidades não estimuladas. Com a aminoguanidina (especialmente para a dose de 75 mg/kg) também notamos uma eficiência menor nas cavidades estimuladas. A administração intraperitoneal do tioglicolato causa inicialmente influxo de neutrófilos e, mais tardiamente (4º dia), aumento do número de macrófagos (GALLILY & FELDMAN, 1967). Nesse momento (4º dia), é que avaliamos o efeito da SEB. Assim, poderíamos especular que os macrófagos foram intensamente ativados

(pelo tioglicolato) de tal forma que a produção de NO no quarto dia está muito baixa. Neste momento (4º dia), outros mediadores (citocinas) seriam mais importantes do que o NO. Ou seja, nessa situação, o NO passa a ter papel secundário (ou nenhum) em relação à capacidade de modular o influxo de neutrófilos pela SEB. Alternativamente, poderíamos pensar que em cavidades com número elevado de macrófagos, a produção de mediadores (incluindo o NO) é tão grande que quantidades maiores dos inibidores (L-NAME, aminoguanidina e dexametasona) seriam necessárias para inibir a formação dos mesmos.

Em resumo, para a compreensão exata dos mecanismos envolvidos na quimiotaxia de neutrófilos pela SEB em cavidades estimuladas e não estimuladas será necessário conduzir mais experimentos, principalmente aqueles avaliando as concentrações de NO e citocinas no lavado peritoneal.

## 5. CONCLUSÕES

1. O L-NAME e a aminoguanidina reduzem o edema inflamatório induzido pela SEB por um mecanismo relacionado a redução do fluxo sanguíneo local, sem afetar diretamente a permeabilidade vascular.

2. Em cavidades peritoneais não-estimuladas, o L-NAME e a aminoguanidina inibem o influxo de neutrófilos induzido pela SEB por um mecanismo relacionado à inibição da iNOS.

3. O NO, gerado de uma cNOS ou iNOS, parece ser importante modulador das atividades edematogênicas e quimiotáticas da SEB.

## ***6. SUMMARY***

In this study we attempted to investigate the role of nitric oxide (NO) on the inflammatory responses (hindpaw oedema, vascular permeability and neutrophil migration) induced by the staphylococcal enterotoxin type B (SEB) in mouse. To achieve this, both non-selective (L-NAME) and selective (aminoguanidine and 7-nitroindazole) NO-synthase (NOS) inhibitors as well as dexamethasone (iNOS induction inhibitor) were used.

Our results showed that L-NAME (7-28 mg/kg, i.v.) and aminoguanidine (25-75 mg/kg, i.v.) significantly reduced SEB-induced paw oedema. Similar results were observed when these inhibitors were administered intraplantarly. The inactive enantiomer D-NAME had no effect on the SEB-induced oedema formation. The inhibition of paw oedema by both L-NAME and aminoguanidine were significantly reversed by the local administration of the prostacyclin analogue iloprost. This suggest that these inhibitors probably acts by reducing regional blood flow. The compound 7-nitroindazole, a substance which preferentially inhibit nNOS, had no effect on the exsudation and paw oedema induced by SEB.

L-NAME and aminoguanidine as well as dexamethasone significantly reduced neutrophil accumulation induced by SEB into mouse peritoneal cavity. In thioglycollate-pretreated cavities, a condition where the number of macrophages is increased, L-NAME and aminoguanidine caused a smaller inhibition of SEB-induced neutrophil migration, as compared to naive cavities. D-NAME had no effect on the neutrophil migration induced by SEB, either in non-stimulated or thioglycollate-treated cavities.

In addition, bNOS activity was reduced by L-NAME at 4 h (28 mg/kg) and 12 h (14-56 mg/kg) after endovenous administration, while aminoguanidine (75 mg/kg, i.v.) was able to reduce the nNOs activity only

when this inhibitor was injected 4 h before. The nNOS activity was unchanged by 7-nitroindazole. The activity of iNOS was significantly inhibited by L-NAME (14-56 mg/kg, i.v., 12 h) and aminoguanidine (25-75 mg/kg, i.v., 12 h).

In conclusion, our results indicate that NO modulate both oedema and neutrophil migration induced by SEB. We suggest that NO involved in inflammatory response was produced by cNOS in the early phase (4 h) and iNOS during the sustained phase (12 h).

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ANTUNES, E.; MARIANO, M.; CIRINO, G.; LEVI, S.; DE NUCCI, G. - Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema. **Br. J. Pharmacol.** **101**: 986-990, 1990.
- ANTUNES, E.; GIRALDELO, C.M.M.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. - Effects of N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine and its D-enantiomer on rat hind-paw oedema. In: **Biology of Nitric Oxide - Physiological and Clinical Aspects**. MONCADA, S.; MARLETTA, M.A.; HIBBS, J.B. & HIGGS, E.A. Portland Press, New York, 1992, 246-266.
- BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A.; RENNARD, S.I.; GOSSMAN, G.L.; NELSON, K.J.; RUBINSTEIN, I. - Inhibition of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. **J. Lab. Clin. Med.** **122**: 388-394, 1993.
- BERGDOLL, M.S. In: REIMANN, H.; BRYAN, F.L. In: **Food borne infections and intoxications**. New York: Academic Press, 1979, 443-494.
- BERGDOLL, M.S. In: **Staphylococci and staphylococcal infections**. Reimann, H. and Bryan, F.L. (Eds), Academic Press, London, 1989, 462-512.
- BERGDOLL, M.S. & CHESNEY, P.J. In: **Toxic shock syndrome**. Bergdoll, M.S. and Chesney, P.J. (Eds), CRC press, Boston, 1991, 51-73.
- BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I.W.; LUEDKE, C.; CERAMI, A. - Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science** **232**: 977-982, 1986.
- BOBAK, D.A. & GUERRANT, R.L. - New developments in enteric bacterial toxins. **Adv Pharmacol.** **23**: 85-101, 1992.
- BRAIN, S.D.; CROSSMAN, D.C.; BUCKLEY, T.L.; WILLIAMS, T.J. - Endothelin-1: demonstration of potent effects on the microcirculation of humans and other species. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** **13**: S147, 1989.
- BROWN, J.F.; CHAFEE, K.A.; TEPPERMAN, B.L. - Role of mast cells, neutrophils and nitric oxide in endotoxin-induced damage to the neonatal rat colon. **Br. J. Pharmacol.** **123**: 31-38, 1998.

- CATTEL, V. & JANSEN, A. - Inducible nitric oxide synthase in inflammation. **Histochem. J.** **27**: 777-784, 1995.
- CHANDER, L.A.; HOWAT, D.W.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.H.; DESA, F.M.; BRAQUET, P.; WILLOUGHBY, D.A. - Comparison of endothelin-1 and -3 on models of inflammation. **Agents Actions** **29**: 27-29, 1990.
- CLANCY, R.M. & ABRAMSON, S.B. - Nitric oxide: A novel mediator of inflammation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **210**: 93-101, 1995.
- CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; CHANG, K.; HASAN, K.S.; IDO, Y.; SON, J.R.; MCDANIEL, M.L. - Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes** **41**: 552-556, 1992.
- CROSS, A.H.; MISKO, T.P.; LIN, R.F.; HICKEY, W.F.; TROTTER, J.L.; TILTON, R.G. - Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. **J. Clin. Invest.** **93**: 2684-2690, 1994.
- CROSTEIN, B.N. & WEISSMAN, G. - The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheum.** **136(2)**: 147, 1993.
- CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. - The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.** **129**: 65-76, 1986.
- CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. - The pivotal role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** **107**: 660-664, 1992.
- DALE, M.M. - The neutrophil leucocyte. In: **Textbook of Immunopharmacology**. Dale, M.M. and Foreman, J.C. Blackwell Scientific Publications, 1984, 36-52.
- DALE, M.M. & FOREMAN, J.C. - Introduction of Immunology and Pathology of Host Defense Mechanisms. In: **Textbook of Immunopharmacology**, Dale, M.M. and Foreman, J. C. (eds). Blackwell Scientific Publications, 1989, 401-411.

- DESOUZA, IVANI A.; BERGDOLL, M.S.; RIBEIRO-DASILVA, G. - Pharmacological characterization of mouse paw edema induced by staphylococcal enterotoxin B. **J. Nat. Toxins** **5**: 61-71, 1996.
- DESOUZA, IVANI A. & RIBEIRO-DASILVA, G. - Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse peritoneal cavity. **J. Nat. Toxins** **5**: 339-348, 1996.
- DI ROSA, M. - Role in inflammation of glucocorticoid-induced phospholipase inhibitory proteins. **Prog. Biochem. Pharmacol.** **20**: 55-62, 1984.
- DI ROSA, M.; RADOMSKI, R.; CARNUCCIO, R.; MONCADA, S. - Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochim. Biophys. Res. Commun.** **172**: 1246-1252, 1990.
- DINARELLO, C.A. - The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.** **163**: 1177-1184, 1991.
- FACIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S.; FERREIRA, S.H. - Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. **Agents Actions** **30**: 344-349, 1990.
- FERENCÍK, M. & STVRTINOVÁ, V. - Endogenous control and modulation of inflammation. **Folia Biol. Praha** **42**: 47-55, 1996.
- FERREIRA, S.H. - Are macrophages the body's alarm cells? **Agents Actions** **10**: 229-230, 1980.
- FERREIRA, S.H. - The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs** **46**: 1-9, 1993.
- FERREIRA, H.H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMA, C.S.P.; FLORES, C.A., SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. - Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur. J. Pharmacol.** **310**: 201-207, 1996.

- FERREIRA, H.H.A.; BEVILACQUA, E.; GAGIOTI, S.M.; DE LUCCA, I.M.; ZANARDO, R.C.; TEIXEIRA, C.E.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. - Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. **Eur. J. Pharmacol.** **358**: 253-259, 1998.
- FERRAZ, J.G.P.; SHARKEY, K.A.; REUTER, K.; ASFAH, S.; TIGLEY, A.W.; BROWN, M.L.; McKNIGHT, W.; WALLACE, J.L. - Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. **Gastroenterology** **113**: 195-204, 1997.
- FLEISCHER, B.; SCHREZENMEIER, H.; CONRADT, H.P. - Cell stimulation by staphylococcal enterotoxins: Role of class II molecules and T cell surface structures. **Cell Immunol.** **119**: 92-101, 1989.
- FLEMING, S.D.; IANDOLO, J.J.; CHAPES, S.K. - Murine macrophage activation by staphylococcal exotoxins. **Infec. Immun.** **59**: 4049-4055, 1991.
- FLORQUIN, S.; AMRAOUI, Z.; DUBOIS, C.; DECUYPER, J.; GOLDMAN, M. - The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. **J. Exp. Med.** **180**: 1153-1158, 1994.
- FOREMAN, J.C. - Peptides and neurogenic inflammation. **Br. Med. Bull** **43**: 386-400, 1987.
- FORSTERMANN, U.; GORSKY, L.D.; POLLOCK, J.S., SCHMIDT, H.H.H.W, HELLER, M.; MURAD, F. - Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **168**: 727-732, 1990.
- GALLILY, R.; WARWICK, A.; BANG, F.B. - Effect of cortisone on genetic resistance to mouse hepatitis virus in vivo and in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **51**: 1158, 1964.
- GALLILY, R. & FELDMAN, M. - The role of macrophages in the induction of antibody in X-irradiated animals. **Immunol.** **12**: 19, 1967
- GAMSE, R.; HOLZER, P.; LEMBECK, F. - Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. **Br. J. Pharmacol.** **68**: 207-213, 1980.

- GIRALDELO, C.M.M.; ZAPELINNI, A.; MUSCARÁ, M.N.; DE LUCA, I.M.S., HYSLOP, S.; CIRINO, G.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. - Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation *in vitro*. **Eur. J. Pharmacol.** **257**: 87-93, 1994.
- GONZALO, J.A., BAIXERAS, E., GONZÁLES-GARCIA, A., GEORGE-CHANDY, A.; VAN ROOIJEN, N.; MARTÍNEZ, A.C. - Differential *in vivo* effect of superantigen and an antibody targeted to the same T cell receptor: activation-induced cell death vs. Passive macrophage-dependent deletion. **J. Immunol.** **152**: 1597-1608, 1994.
- HARKNESS, R.A. - The characteristic cell of acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte, and its biochemistry. **Molec. Aspects Med.** **4 (3/4)**: 191-207, 1981.
- HASKÓ, G.; VIRÁG, L.; EGNACZYK, G.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C - The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. **Eur. J. Immunol.** **28**: 1417-1425, 1998.
- HERBERT, M.K. & HOLZER, P. - Nitric oxide mediates the amplification by interleukin-1 $\beta$  of neurogenic vasodilatation in the rat skin. **Eur. J. Pharmacol.** **260**: 89-93, 1994.
- HIBBS, J.B. JR; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; GRANGER, D.L.; DRAPIER, J.C.; AMBER, I.J.; LANCASTER, J.R. JR. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine. In: **Bioregulatory System**, MONCADA, S. AND HIGGS, E.A. Elsevier, 1990, 189.
- HOLZER, P. - Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience** **24**: 739-768, 1988.
- HUGHES, S.R.; WILLIAMS, T.J.; BRAIN, S.D. - Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. **Eur. J. Pharmacol.** **191**: 481-484, 1990.
- IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI-ROSA, M. - Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.** **211**: 177-182, 1992.

- IANDOLO, J.J. - Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annual Rev. Microbiol.** **43**: 375-402, 1989.
- KAPLAN, S.S.; BILIAR, T.; CURRAN, R.D.; ZDZIARSKI, U.E.; SIMMONS, R.L.; BASFORD, R.E. - Inhibition of chemotaxis with N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. **Blood** **74**: 1885-1887, 1989.
- KAJEKAR, R.; MOORE, P.K.; BRAIN, S.D. - Essential role of nitric oxide in neurogenic inflammation in rat cutaneous microcirculation. **Circ. Res.** **76(3)**: 441-447, 1994.
- KLUGER, M.J. - Fever, role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.** **71**: 93-127, 1991.
- KOLLS, J.; XIE, J.; LEBLANC, R.; MALINSKI, T.; NELSON, S.; SUMMER, W.; GREENBERG, S.S. - Rapid induction of messenger RNA for nitric oxide synthase II in rat neutrophils in vivo by endotoxin and its suppression by prednisolone. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **205**: 220-229, 1994.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. - Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 4651-4655, 1991.
- KUBES, P. & GRANGER, D.N. - Nitric oxide modulates microvascular permeability. **Am. J. Physiol.** **262**: H611-615, 1992.
- LeCLAIRE, R.D.; KELL, W.M.; SADIQ, R. A.; DOWNS, M.B.; PARKER, G.W. - Regulation of staphylococcal enterotoxin B-elicited nitric oxide production by endothelial cells. **Infect. Immunity** **63**: 539-546, 1995.
- LEIBOVICH, S.J.; POLVERINI, P.J.; FONG, T.W.; HARLOW, L.A.; KOCH, A. E. - Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **91**: 4190-4194, 1994.
- LEVY, L. - Carragenan paw edema in the mouse. **Life Science** **8**: 601-606, 1969.

- LIPPE, I.T.; STABENTHEINER, A.; HOLZER, P. - Participation of nitric oxide in the mustard oil-induced neurogenic inflammation of the rat paw skin. **Eur. J. Pharmacol.** **232**: 113-120, 1993.
- LYKKE, A.W.J. & CUMMINGS, R. - Inflammation in healing I. Time course and mediation of exudation in wound healing in rat. **Br. J. Exp. Path.** **50**: 309-318, 1969.
- MACMICKING, J.; XIE, QIAO-WEN; NATHAN, C. - Nitric oxide and macrophage function. **Annual Rev. Immunol.** **15**: 323-350, 1997.
- MACMILLIAN, R.T. & FOSTER, S.J. - Leukotriene B<sub>4</sub> and inflammatory diseases. **Agents Actions** **24**: 114-120, 1988.
- MACKAY, C.R. & IMHOF, B.A. - Cell adhesion in the immune system. **Immunol. Today** **14**: 99-102, 1993.
- MARRACK, P. & KAPPLER, J. - The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science** **248**: 705-711, 1990.
- MARIANI-PEDROSO, S.R.; BIZETO, L.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; De NUCCI, G. - Dissimilarity between prostaglandin E<sub>1</sub> and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo. **Prost. Leuk. Essent. Fatty Ac.** **52**: 399-402, 1995.
- MAYHAN, W.G. - Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. **Inflammation** **16(4)**: 295-305, 1992.
- McCALL, T.B.; FEELISCH, M.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. - Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br. J. Pharmacol.** **102**: 234-238, 1991.
- MEDEIROS, M.V.; BINHARA I.M.; MORENO, H.J.; ZATZ R.; De NUCCI, G.; ANTUNES, E. - Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **Eur. J. Pharmacol.** **285**: 109-114, 1995.

- MERHI, M.; DUSTING, G.J.; KHALIL, Z. - CGRP and nitric oxide of neuronal oringin and their involvement in neurogenic vasodilation in rat skin microvasculature. **Br. J. Pharmacol.** **123**: 863-868, 1998.
- MIETHKE, T.; WAHL, C., HEEG, K.; ECHTENACHER, B.; KRAMMER, P.H.; WAGNER, H. - T cell-mediated lethal shock triggered in mice by superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.** **175**: 91-98, 1992.
- MISKO, T.P.; MOORE, W.M.; KASTEN, T.P.; NICKOLS, G.A.; CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; McDANIEL, M.L.; WILLIAMSON, J.R.; CURRIE, M.G. - Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. **Eur. J. Pharmacol.** **233**: 119-125, 1993.
- MICUSAN, V.V. & THIBODEAU, J. - Superantigens of microbiol oringin. **Seminars in Immunology** **5**: 3-11, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. - Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** **43**: 109-142, 1991.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. - The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** **329**: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. - XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol. Rev.** **49**: 137-142, 1997.
- MOORE, P.K.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.A.; HART, S.L. - 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol.** **108**: 296-297, 1993.
- NOIRI, E.; PERESLENI, T.; SRIVASTAVA, N.; WEBER, P.; BAHOU, W.F.; PEUNOVA, N.; GOLIGORSKI, S. - Nitric oxide is necessary for a switch from statinary to locomotion phenotype in epithelial cells. **Am. J. Physiol.** **270**: C794-802, 1996.
- O'DUFFY, G. & CHAHL, L.A. - Effect of catecholamines on edema induced by inflammatory agents in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** **57**: 377-386, 1979.

- OSBORN, L. - Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell** **62**: 3-6, 1990.
- PETERSON, G.L. - A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Annal Biochem.** **83**: 346-356, 1977.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. - Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **87**: 10043-10047, 1990.
- RANKIN, J.A.; SYLVESTER, I.; SMITH S.; TOSHIMURA, T.; LEONARD, E.J. - Macrophages culture in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J. Clin. Invest.** **80**: 1554-1564, 1990.
- REYES, A. A.; PORRAS, B.H.; CHASALOW, F.I.; KLAHR, S. - L-arginine decreases the infiltration of the kidney by macrophages in obstructive nephropathy and puromycin-induced nephrosis. **Kidney Int.** **45**: 1346-1354, 1994.
- RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by release of macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol.** **71**: 717-725, 1990.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunol.** **73**: 472-477, 1991.
- ROSE, J.W.; HILL, K.E.; WADA, Y.; KURTZ, C.I.; TSUNODA, I.; FUJINAMI, R.S.; CROSS, A.H. - Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine, reduces inflammation and demyelination produced by Theiler's virus infection. **J. Neuroimmunol.** **81**: 82-89, 1998.
- ROSSI, A.G. & HELLEWELL, P.G. - Mechanisms of neutrophil accumulation in tissues. In: **Handbook of Immunopharmacology**. Hellewell, P. G. and Willians, T.J. (Eds) Academic press, 1994, 223-243.

- SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. - Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.** **118**: 829-838, 1996.
- SCHMIDT, H.H.H.W.; HOFMANN, H.; OGILVIE, P. - Regulation and dysregulation of constitutive nitric oxide synthases types I and III. **Curr. Topics in Microbiol. and Immunol.** **196**: 75-84, 1993.
- SKUBALLA, W.; RADUCHEL, B.; VORBRUGGEN, H. - Chemistry of stable prostacyclin analogues: synthesis of iloprost. In: Prostacyclin and its stable analogue iloprost, eda R Gryglewslis and G Stock, Springer-Verlag, 1987, p.17-24.
- SMITH, M.J.H.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; WALKER, J.R. - Anti-inflammatory activity of bacterial endotoxin. **J. Pharm. Pharmac.** **29**: 702-704, 1977.
- SOUTHAN, G.J. & SZABÓ, C. - Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem. Pharmacol.** **51**: 383-394, 1996.
- SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. - Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions.** **24**: 377-380, 1988.
- STARUCH, M.J. & WOOD, D.D. - Reduction of serum interleukin-1-like activity after treatment with dexamethasone. **J. Leukotr. Biol.** **37**: 193-197, 1985
- SZABÓ, C. & THIEMERMANN, C. - Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Adv. Pharmacol.** **34**: 113-153, 1995.
- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLEWELL, P.G. - Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammation reactions in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.** **110**: 1515-1521, 1993.
- VIANNA, R.M.J. & CALIXTO, J.B. - Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg<sup>9</sup>-BK in mouse pleurisy. **Br. J. Pharmacol.** **123**: 281-291, 1998.

WHALEY, K. & FERGUSON, A. - Molecular aspects of complement activation. **Mol. Aspects Med.** 4: 209-273, 1981.

WILKINSON, P.C. - In: **Celular accumulation and inflammation**. Dale, M.M. & Foreman, J.C. (eds) Textbook of immunopharmacology. Blackwell Scientific Publication, 1984, 217-232.

WILLIAMS, T.J. - Vascular responses and their suppression vasodilatation and edema. In: **Handbook of Inflammation** Bonta, I.L.; Bray, M.A. & Parnhan, M.J., vol. 5, Elsevier, 1985, 49-59.

YANCEY, K.B. - Biological properties of human C5a: selected *in vitro* and *in vivo* studies. **Clin. Exp. Immunol.** 71: 207-211, 1989.

ZEMBOWICZ, A. & VANE, J.R. - Induction of nitric oxide synthase activity by toxic shock syndrome toxin 1 in a macrophage-monocyte cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89: 2051-2055, 1992.

## ERRATA

Na lista de materiais onde se lê tioglicolato de sódio deve-se ler meio de tioglicolato de sódio

Na página 14 onde se lê “ad libidum” deve-se ler “ad libitum”

Na página 17 onde se lê 10,000 rpm deve-se ler 10.000

Na página 23 onde se lê tioglicolato de sódio deve-se ler meio de tioglicolato de sódio

Na página 24 onde se lê heparina 5 UI/ml deve-se ler heparina 5000 UI/ml

Na página 57 onde se lê remoção do NO deve-se ler redução do NO

Na página 61 onde se lê CUNHA & FERREIRA, 1986 deve-se ler MORRISON & JACOBS, 1976\*

\*MORRISON, D.C. & JACOBS, P.M. - Inhibition of lipopolysaccharide-initiated activation of serum complement by polymyxin B. **Infect Immun.** 13: 298-301, 1976.