

Daniel Fernandes

**INIBIÇÃO DO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO
INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE DOADORES DE ÓXIDO
NÍTRICO: ENVOLVIMENTO DA GUANILATO CICLASE
SOLÚVEL E DE CANAIS DE POTÁSSIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

FLORIANÓPOLIS-SC

2002

**“INIBIÇÃO DO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO
INDUZIDA PELA INJEÇÃO DE DOADORES DE ÓXIDO
NÍTRICO : ENVOLVIMENTO DE GUANILATO CICLASE
SOLÚVEL E DE CANAIS DE POTÁSSIO”**

POR

DANIEL FERNANDES

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora *ad hoc*, composta
pelos Professores Doutores:**

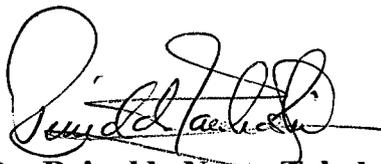
**Jamil Assreuy
Orientador – PGFMC – UFSC**

**Mauro Martins Teixeira
Depto. de Bioquímica e Imunologia – UFMG**

**Iolanda M. Fierro
Depto. de Farmacologia e Psicobiologia – UERJ**

**Carlos Rogério Tonussi
PGFMC - UFSC**

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2002.



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa**

FERNANDES, D. Inibição do edema de pata de camundongo induzido pela injeção de doadores de óxido nítrico: envolvimento da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio. Florianópolis, 2002, 98 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Professor Doutor Jamil Assreuy .

Defesa: 13/02/02

O [óxido nítrico] é uma molécula com inúmeras ações em vários sistemas. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do tratamento sistêmico prévio de [doadores de NO] no processo de [inflamação] aguda. O pré-tratamento de camundongos com SNP ou SNAP (4 h ou 12) reduziu (~50%) o edema de pata induzido por carragenina, sulfato de dextrana, bradicinina e histamina, mas não reduziu o edema induzido por serotonina. As alterações na permeabilidade vascular e na migração de neutrófilos para o tecido foram avaliados através da medida do extravasamento por azul de Evans e da determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), respectivamente. O pré-tratamento com SNP reduziu significativamente tanto o extravasamento plasmático como o aumento da atividade da MPO. Para testar a participação da [guanilato ciclase] e [canais de K⁺] no efeito redutor dos doadores de NO sobre o edema de pata, os animais foram pré-tratados com SNP 8 h antes da injeção de carragenina. O [azul de metileno] ou [tetraetilamônio] foram injetados em grupos de animais 30 min antes ou 2, 4 ou 6 h após a injeção de SNP. O azul de metileno bloqueou o efeito redutor do NO no edema de pata quando injetado 30 min antes ou 2 h depois do SNP, mas não 4 ou 6 h após a injeção de doadores de NO. O TEA bloqueou o efeito redutor do NO no edema de pata em todos os tempos avaliados. Estes resultados mostram que uma única injeção de doadores de NO exerce um importante efeito antiinflamatório. Este efeito é de longa duração persistindo por períodos de tempo muitos maiores que a meia-vida do NO. Este efeito é dependente de cGMP, nas primeiras horas após a injeção de doadores de NO, e de canais de K⁺, durante todo o tempo de análise. Portanto o efeito de longa duração do NO parece estar estreitamente relacionado com a ativação de canais de K⁺.

*Só desfrutamos realmente o
sucesso quando existe a
possibilidade do fracasso.*

(Freeman Dyson)

A Deus

Por permitir que chegasse até aqui

Aos meus pais, Pedro Fernandes e Lourdes Z. C. Fernandes, pela eterna dedicação a minha vida, por todo amor e apoio sempre presentes.

A minha irmã Patrícia Fernandes pela grande amizade, amor e carinho.

Ao meu orientador Jamil Assreuy por mostrar-me a beleza da ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela amizade, oportunidade e paciência. Deixo também registrada minha profunda admiração pelo seu profissionalismo, pela forma apaixonada como transmite seus conhecimentos e por sua dedicação a ciência e ao ensino.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos importantes para realização deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela importante contribuição em minha formação científica.

À Maria Martha Campos, pelo valioso auxílio em alguns experimentos.

À Maria Cláudia Santos da Silva pela inestimável amizade e inúmeras caronas ao longo deste tempo.

Ao José Eduardo da Silva Santos pela interminável paciência e por todos os ensinamentos transmitidos desde da iniciação científica, e que foram fundamentais para minha formação. Agradeço também pela preciosa amizade e importante colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À técnica do laboratório Adriane Madeira pelo frequente auxílio e harmoniosa convivência.

Aos colegas de laboratório: Alexandre Meyer, Danielle Duma, Emiliana C. Domingues, Januária R. Pereira, Márcia R. Terluk, Rafael L. Prim, Renata S.A. Costa pela agradável convivência, amizade e companheirismo, tornando-se pessoas muito importantes na minha vida.

A todos colegas e amigos do curso de Pós-graduação em Farmacologia.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Curva de calibração.....	43
Figura 2 - Efeito de doadores de NO (SNP e SNAP) no edema de pata de camundongo.....	51
Figura 3 - Avaliação do efeito antiedematogênico do SNP administrado 12 ou 24 horas antes da carragenina.....	54
Figura 4 - Efeito do SNP no edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios.....	56
Figura 5 - Efeito do nitroprussiato de sódio no extravasamento de azul de evans e na atividade da mieloperoxidase.....	59
Figura 6 - Efeito do azul de metileno (AM) na redução do edema de pata causado por SNP.....	61
Figura 7 - Efeito do tetraetilamônio (TEA) na redução do edema de pata causado por SNP.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das Óxido Nítrico Sintases (NOS)	25
Tabela 2 - Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) na pressão arterial de ratos...	50
Tabela 3 - Efeito de doadores de NO (SNP eSNAP) no edema de pata de camundongo induzido por carragenina.....	52
Tabela 4 - Efeito do SNP no edema de pata de camundongo induzido por sulfato de dextrana.....	53
Tabela 5 - Avaliação do efeito antiedematogênico do SNP administrado 12 ou 24 horas antes da carragenina.....	55
Tabela 6 - Efeito do SNP no edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios.....	57
Tabela 7 - Efeito do azul de metileno (AM) na redução do edema de pata causado por SNP.....	62
Tabela 8 - Efeito do tetraetilamônio (TEA) na redução do edema de pata causado por SNP.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- Ácido araquidônico
ADP	- Difosfato de adenosina
AM	- Azul de metileno
ATP	- Trifosfato de adenosina
cGMP	- Monofosfato cíclico de guanosina
cNOS	- Óxido nítrico sintase constitutiva
COX	- Ciclooxygenase
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
EDRF	- Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	- Dinucleotídeo de flavina
FMLP	- Formil-metionil-leucil-fenilalanina
FMN	- Mononucleotídeo de flavina
GTP	- Trifosfato de guanosina
HETE	- Ácido hidroecosatetraenóico
ICAM	- Molécula de adesão intercelular (do inglês: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>)
IFN	- Interferon
IL-1	- Interleucina-1
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
K _{ATP}	- Canal de K ⁺ ATP-dependente
K _{Ca}	- Canal de K ⁺ dependente de cálcio
K _{IR}	- Canal de K ⁺ retificador de influxo
K _v	- Canal de K ⁺ dependente de voltagem
LT	- Leucotrieno
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
LX	- Lipoxina
MPO	- Mieloperoxidase
mRNA	- RNA mensageiro

NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NAP	- N-acetil-DL-penicilamina
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NO	- Óxido nítrico
NO ⁻	- Ânion nitroxil
NO ⁺	- Cátion nitrosônio
NO ₂ ⁻	- Íon Nitrito
NOS	- Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	- Ânion superóxido
ONOO ⁻	- Ânion peroxinitrito
PECAM	- Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta (do inglês: <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>)
PG	- Prostaglandina
PMN	- Leucócito polimorfonuclear neutrófilo
pS	- pico siemens
RSNO	- S-nitrosotiol
sGC	- Guanilato ciclase solúvel
SH-	- Sulfidril
SIN-1	- 3-morfolinil sidnonimina
SNAP	- S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNP	- Nitroprussiato de sódio
TEA	- Tetraetilamônio
THB ₄	- Tetrahidrobiopterina
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
TX	- Tromboxano
VCAM	- Molécula de adesão vascular (do inglês: <i>Vascular Adhesion Molecule</i>)

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula efetora caracterizada nos últimos anos como importante modulador inflamatório. Em trabalhos anteriores, nosso laboratório mostrou que a administração de uma única dose de doadores de NO ou uma infusão de 30 minutos com baixas concentrações destes compostos causou alterações de longa duração na reatividade vascular. Como parte da resposta inflamatória é dependente de eventos vasculares, decidimos investigar a influência do tratamento sistêmico com doadores de NO no edema de pata de camundongos induzido por vários estímulos inflamatórios. Camundongos Swiss-44 fêmeas foram injetados intradermicamente no coxim plantar com carragenina (300 µg/pata), sulfato de dextrana (200 µg/pata), bradicinina (3 nmol/pata), serotonina (10 nmol/pata) ou histamina (100 nmol/pata). O edema de pata foi medido pletismograficamente, em intervalos de tempo que variaram dependendo do estímulo inflamatório usado. Para estudar-se a influência do óxido nítrico no edema de pata, foram usados dois doadores de NO, nitroprussiato de sódio (SNP; 1,5, 5 e 10 µmol/kg) ou S-nitroso-DL-acetilpenicilamina (SNAP; 7, 14 e 28 µmol/kg), injetados s.c. 4, 12 ou 24 h antes do estímulo inflamatório. Nossos resultados mostram que o pré-tratamento com SNP ou SNAP (4 ou 12 h) reduziu em aproximadamente 50% o edema de pata induzido por carragenina, sulfato de dextrana, bradicinina e histamina, mas não por serotonina. As alterações na permeabilidade vascular e na migração de neutrófilos para o tecido foram avaliadas através da medida do extravasamento de azul da Evans e da determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), respectivamente. O pré-tratamento com SNP reduziu significativamente tanto o extravasamento plasmático como o aumento da atividade da MPO, induzidos pela carragenina. Para testar a participação da guanilato ciclase e canais de K⁺ no efeito redutor dos doadores de NO sobre o edema de pata, os animais foram pré-tratados com SNP (10 µmol/kg) 8 h antes da injeção de carragenina. Em seguida, azul de metileno (15,6 µmol/kg, s.c), ou tetraetilamônio (TEA, 300 µmol/kg) foram injetados em grupos de animais 30 min antes ou 2, 4 ou 6 h após a injeção de SNP. O azul de metileno bloqueou o efeito redutor do NO no edema de pata quando injetado 30 min antes ou 2 h depois do SNP, mas não 4 ou 6 h após a injeção de doadores de NO. O TEA bloqueou o efeito redutor do NO no edema de pata em todos os tempos avaliados. Estes resultados mostram que uma única injeção de doadores de NO exerce um importante efeito antiinflamatório evidenciado pela redução no extravasamento plasmático e infiltração de neutrófilos no modelo de edema de pata. Este efeito é de longa duração persistindo por períodos de tempo muitos maiores que a meia-vida do NO. Este efeito é dependente de cGMP, nas primeiras horas após a injeção de doadores de NO, e de canais de K⁺, durante todo o tempo de análise. Portanto o efeito de longa duração do NO parece estar estreitamente relacionado com a ativação de canais de K⁺.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a free radical with important actions in several biological systems. We have previously shown that NO donors changed the vascular reactivity, decreasing the response to vasoconstrictors and, at the same time, increasing the response to vasodilators. Since the inflammatory response releases vasoactive mediators, the objective of this work was to study the influence of NO donors pretreatment on the mouse paw edema induced by several inflammatory stimuli. Female Swiss-44 mice were injected intradermally with carrageenan (300 µg/paw), dextran sulfate (200 µg/paw), bradykinin (3 nmol/paw), serotonin (10 nmol/paw) or histamine (100 nmol/paw) in the right hindpaw. Paw edema was measured by plethysmometry, at the indicated time intervals which varied depending on the inflammatory stimulus used. To study the influence of NO, the NO donors sodium nitroprusside (SNP; 1.5, 5 and 10 µmol/kg) or S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP; 7, 14 and 28 µmol/kg) were injected s.c. 24, 12 or 4 h before the inflammatory stimuli. The results show that the injection of one single dose of SNP or SNAP (4 or 12 h before inflammatory stimulus) reduced (~50%) the paw edema induced by carrageenan, dextran sulfate, bradykinin and histamine, but not by serotonin. Changes in microvascular permeability and neutrophil infiltration was measured by Evans blue leakage and myeloperoxidase activity, respectively. Pre-treatment with SNP significantly reduced both plasma exudation and neutrophil infiltration. To investigate the involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels in the NO inhibitory effect on carrageenan-induced paw edema, we pre-treated animals with SNP (10 µmol/kg) 8 h before carrageenan injection. Methylene blue (15.6 µmol/kg, s.c.) or tetraethylammonium (TEA; 300 µmol/kg, s.c.) were injected in distinct groups 30 min before or 2, 4 or 6 h after SNP injection. Methylene blue blocked SNP-induced reduction in mouse paw edema injected 30 min before or 2h after SNP, but not 4 or 6 h after the NO donor injection. TEA blocked SNP-induced reduction in mouse paw edema if injected 30 min before or 2, 4 or 6 h after SNP. The present study demonstrated that a single injection of NO donors exerts a long-lasting anti-inflammatory effect evidenced by reductions in vascular permeability and in neutrophil infiltration in the mouse paw. This NO effect is dependent on cGMP (in its initial phase) and on potassium channels (during all the time of analysis).

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Abreviaturas.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
I – Introdução.....	1
1. INFLAMAÇÃO.....	2
1.1. Eventos vasculares.....	3
1.2. Eventos celulares.....	5
1.3. Mediadores inflamatórios.....	11
2. ÓXIDO NÍTRICO	18
2.1. Histórico.....	18
2.2. Química e enzimologia.....	20
2.3. Alvos moleculares do óxido nítrico.....	26
2.4. Óxido nítrico e inflamação.....	32
2.5. Óxido nítrico e canais de potássio.....	35
II – Objetivos.....	38
III – Material e Métodos.....	40
3.1. Animais.....	41
3.2. Procedimentos experimentais.....	41
3.2.1 Avaliação da pressão arterial em ratos.....	41
3.2.2 Edema de pata de camundongo.....	42
3.2.3 Efeito de doadores de óxido nítrico no edema de pata de camundongo....	44
3.2.4 Avaliação do extravasamento por azul de evans no edema de pata de camundongo.....	44
3.2.5 Dosagem da atividade da mieloperoxidase	45
3.2.6 Inibição da guanilato ciclase solúvel.....	46
3.2.7 Bloqueio dos canais de potássio.....	46
3.3. Compostos.....	47
3.4. Análise estatística.....	47

IV – Resultados	48
4.1. Efeito da administração subcutânea de nitroprussiato de sódio na pressão arterial de ratos.....	49
4.2. Efeito de doadores de óxido nítrico no edema de pata de camundongos..	49
4.3. Efeito do nitroprussiato de sódio no extravasamento de azul de evans e na atividade da mieloperoxidase.....	58
4.4. Envolvimento da guanilato ciclase solúvel e canais de potássio no efeito inibitório do nitroprussiato de sódio no edema de pata de camundongo....	60
V – Discussão	65
VI – Referências Bibliográficas	81

INTRODUÇÃO

1. INFLAMAÇÃO

A inflamação constitui-se de uma complexa reação em organismos multicelulares, mais especificamente de tecidos vascularizados destes organismos, em resposta a uma lesão, trauma ou infecção. O processo inflamatório protege o organismo contra infecções e facilita a reparação e cicatrização do tecido (revisto em Sedgwick e Willoughby, 1995). Na reparação, o tecido lesado é substituído por células da mesma linhagem daquelas lesadas ou por células do tecido conjuntivo, ou ainda uma combinação dos diferentes tipos celulares. Dependendo da extensão da substituição do tecido original pelo tecido cicatricial, pode haver comprometimento ou perda da função do órgão (revisto em Davidson, 1992).

A fase inicial da inflamação, chamada de fase aguda, geralmente tem duração relativamente curta e as primeiras manifestações clínicas observadas são eritema, edema, calor e dor, como descritas por Cornelius Celsus, no início da era Cristã. O quinto sinal, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado, foi descrito posteriormente por Virchow no século XIX.

A reação inflamatória aguda pode, basicamente, ser caracterizada pela ocorrência de dois tipos principais de eventos: i) os vasculares, onde observa-se alteração do calibre dos vasos e aumento de permeabilidade venular e ii) os celulares, que iniciam-se com o processo de marginação dos leucócitos, seguido pela adesão destes à parede do vaso e posterior passagem para o tecido extravascular.

A inflamação crônica geralmente ocorre quando a inflamação aguda não é resolvida. Apesar de poder seguir-se à inflamação aguda, a inflamação crônica com frequência inicia-se, como um processo de baixa intensidade e constante. Esta fase,

geralmente de longa duração, caracteriza-se em termos histológicos por densa infiltração de linfócitos e macrófagos, e uma concomitante proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo. A inflamação crônica pode levar a destruição tecidual e fibrose trazendo graves efeitos deletérios para o indivíduo (revisto em Broide, 1991 e Cotran *et al.*, 1994).

As respostas vasculares e celulares na fase aguda ou crônica da inflamação são mediadas tanto por fatores químicos como plasmáticos e celulares. Estas substâncias, denominadas mediadores da inflamação, são liberadas concomitante e sequencialmente à resposta inflamatória, e atuam amplificando e influenciando a evolução desta resposta (revisto em Bauhmann e Gauldie, 1994 e Cotran *et al.*, 1994).

1.1. EVENTOS VASCULARES

Alterações do fluxo e do calibre dos vasos ocorrem muito precocemente após o estímulo inflamatório. Após um período breve e transitório de vasoconstrição, ocorre uma vasodilatação como consequência da ação de mediadores, que são formados e/ou liberados na microcirculação. Entre estas substâncias citam-se aquelas de origem plasmática, como a bradicinina, e as substâncias de origem celular, como a histamina e as prostaglandinas (revisto em Haanen e Vermes, 1995). À esta vasodilatação sobrevém, assim, um aumento local do fluxo sanguíneo, causando calor e rubor. Esta vasodilatação causa lentificação do fluxo, com consequente estase do sangue. Ocorre também, aumento de permeabilidade nas vênulas pós-capilares e exsudação de líquido. O exsudato líquido contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos e

incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas do plasma: o sistema complemento, o sistema de coagulação, o sistema fibrinolítico e o sistema calicreína-cininas. Os componentes protéicos e peptídicos derivados destes sistemas interagem entre si de forma complexa, modulando a ação dos demais, amplificando e otimizando a resposta inflamatória. Portanto, durante a ativação destas cascatas enzimáticas são formados fatores que opsonizam os agentes agressores e fatores que induzem a migração de células de defesa. A rede de fibrina que se forma no local inflamado impede a disseminação dos agentes lesivos e serve de suporte para migração (revisto em Gallin *et al.*, 1992).

O aumento de permeabilidade vascular, com extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício, é uma das marcas registradas da resposta inflamatória aguda. O extravasamento de líquido rico em proteínas a partir do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica do líquido intersticial. Este fenômeno, aliado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação, leva à fuga de líquido e seu acúmulo no tecido intersticial, conduzindo à formação do edema (revisto em Cotran *et al.*, 1994).

No início da década de sessenta, Majno e Palade (1961) mostraram que o aumento de permeabilidade induzido por mediadores como histamina e serotonina, que têm efeitos similares na fase inicial da inflamação, estava associado ao aparecimento de aberturas ou fendas (*gaps*) no endotélio de vênulas pós-capilares. Este foi o primeiro trabalho que correlacionou a permeabilidade microvascular e a ultraestrutura da parede da microcirculação. Já no final dos anos 60, Majno e colaboradores (1969) mostraram que o núcleo das células endoteliais das vênulas apresentava uma aparência enrugada e sugeriram que a contração das células

endoteliais era a base do aumento do extravasamento de macromoléculas. Trabalhos subsequentes, em vários outros laboratórios, confirmaram que a histamina, a bradicinina, a serotonina e muitos outros mediadores, abrem fendas no endotélio de vênulas pós-capilares mas não influenciam a estrutura de capilares (revisto em Michel e Curry, 1999).

A fase tardia do aumento de permeabilidade decorrente de lesões do tipo térmica ou química, envolve ambos, os capilares e as vênulas. Mais uma vez, parece estar relacionado com o desenvolvimento de aberturas entre células endoteliais adjacentes (Cotran e Majno, 1964). Aberturas e fenestras nos capilares endoteliais são também induzidas por citocinas (outros mediadores da resposta inflamatória que serão abordadas mais a frente) e fatores de crescimento (Roberts e Palade, 1995).

1.2. EVENTOS CELULARES

As primeiras descrições de achados microscópicos decorrentes da resposta a um estímulo inflamatório datam de 150 anos atrás, e foram objeto de uma série de conferências em 1889 por Julius Cohnheim. Este pesquisador foi o primeiro a utilizar o microscópio para visualizar vasos sanguíneos inflamados em membranas delgadas transparentes, como mesentério e língua de rãs. Através da observação das alterações no fluxo sanguíneo, do edema subsequente (devido ao aumento de permeabilidade vascular) e da migração leucocitária característica, Cohnheim descreveu achados com tal precisão e clareza, que foram muito pouco aperfeiçoados por técnicas mais modernas (Cohnheim, 1889).

Cohnheim observou que a parede do vaso era responsável por uma série de eventos no processo inflamatório. Seus experimentos o conduziram à importante conclusão que “inflamação é a expressão e consequência de alterações moleculares na parede do vaso”. Esta notável observação, considerando que Kekulé somente imaginou que átomos de carbono pudessem formar moléculas em 1854, foi abrilhantada pela observação que o estímulo inflamatório resulta na acumulação de leucócitos somente no ponto de aplicação do estímulo. Os locais da microcirculação livres de estímulo permanecem também livres de leucócitos. Cohnheim percebeu que as células do sangue em contínuo movimento não podiam ser as únicas responsáveis pela resposta inicial que determinava a localização espacial dos leucócitos, sua adesão e posterior migração para o sítio inflamatório.

O rápido progresso no campo da inflamação nos últimos anos revelou a natureza das moléculas antecipadas por Cohnheim. A migração dos leucócitos do vaso para o local da inflamação definitivamente envolve a regulação de múltiplas moléculas de adesão tanto nas células que estão migrando como no endotélio (revisto em Walzog e Gaehtgens, 2000).

A identificação de moléculas envolvidas no processo de recrutamento de leucócitos mostrou que a migração depende de sofisticada interação entre leucócitos e células endoteliais. Portanto este último tipo celular contribui ativamente através da expressão de moléculas de adesão em sua superfície e secreção de mediadores solúveis.

No sangue que está fluindo no interior dos vasos, os leucócitos normalmente ficam confinados a uma coluna axial central enquanto que a faixa de fluido em contato com o endotélio é pobre em células. À medida que o fluxo se lentifica no

início da inflamação, os leucócitos saem da coluna líquida central e assumem uma posição periférica, passando a margear a superfície endotelial. Portanto, a marginação hidrodinâmica é necessária para permitir o contato inicial entre leucócitos e endotélio.

A saída de leucócitos dos vasos para o tecido adjacente onde está ocorrendo a reação inflamatória segue uma sequência bem conhecida. Inicialmente, os leucócitos rolam sobre as células endoteliais (*rolling*). Esta interação fraca e reversível inicial é seguida por uma adesão firme do leucócito ao endotélio (*adhesion*). Esta adesão firme permite que o leucócito espraie-se sobre o endotélio (*spreading*), após o que ele inicia o processo de transmigração para fora do vaso (*migration*). Cada um dos estágios mencionados acima envolve a participação de diferentes famílias de moléculas de adesão. Estas moléculas, dependendo de sua estrutura funcional e similaridade genética, dividem-se em 3 famílias a saber: as integrinas, as selectinas e a superfamília das imunoglobulinas (Bevilacqua, 1993; Hellewel, 1993).

O processo de rolagem é mediado pela família de glicoproteínas conhecidas como selectinas. A família das selectinas consiste de três diferentes classes de moléculas: L-selectina, P-selectina e E-selectina. A L-selectina é expressa constitutivamente na maioria dos leucócitos. A P-selectina é constitutivamente expressa em plaquetas, enquanto nas células endoteliais fica armazenada dentro dos corpúsculos de Weibel-Palade podendo ser mobilizada para superfície da célula dentro de minutos, mediante a ativação por uma variedade de mediadores inflamatórios. Assim como a P-selectina, a E-selectina não é constitutivamente expressa em células endoteliais. Entretanto, sua expressão está totalmente sob o

controle de fatores transcricionais, sendo sua síntese induzida por citocinas como interleucina-1 (IL-1) ou fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (revisto em Walzog e Gaehtgens, 2000).

Os três tipos de selectinas podem mediar direta ou indiretamente o *rolling* de leucócitos. Entretanto, devido a diferentes cinéticas de expressão destas moléculas e/ou de seus ligantes, diferentes selectinas desempenham papel importante em tempos diferentes durante o curso da reação inflamatória (revisto em Collins, 1995 e Kansas, 1996).

Devido a sua velocidade agora reduzida, os leucócitos são expostos aos mediadores secretados pelas células endoteliais e, se ativados, aderem firmemente ao endotélio através da interação com famílias específicas de moléculas de adesão. As integrinas leucocitárias medeiam a firme adesão dos leucócitos por ligarem-se a membros da família das imunoglobulinas presentes nas células endoteliais. As integrinas correspondem a uma família de heterodímeros protéicos constituídos de uma subunidade α (120-180 KDa) ligada não-covalentemente a uma subunidade β (90-110 KDa). As duas subunidades são necessárias para a interação adesiva das integrinas e apresentam elevada identidade estrutural e funcional (revisto em Brow e Goodwin, 1988).

As integrinas representam uma grande família de proteínas classificada pela subunidade β . As integrinas β_1 (CD29), β_2 (CD18), β_3 (CD61) e β_7 são as comprometidas com o recrutamento de leucócitos, com as β_2 atuando como principal personagem na firme adesão de leucócitos subsequente ao *rolling*. A rolagem de leucócitos constitui pré-requisito essencial para firme adesão mediada pelas integrinas *in vivo*, uma vez que estas não são capazes de ligar aos seus respectivos

ligantes nas células endoteliais, a menos que a velocidade dos leucócitos tenha sido reduzida para um valor crítico, que é alcançado pela rolagem mediada pelas selectinas (revisto em Walzog e Gaehtgens, 2000).

Outras importantes moléculas de adesão pertencem à superfamília das imunoglobulinas que servem de ligantes para as integrinas. Os principais membros desta famílias são as ICAM (*Intracellular Adhesion Molecules*; associadas com a etapa de firme adesão dos leucócitos ao endotélio através da interação com as β_2 integrinas; revisto em Bevilacqua *et al.*, 1994), as VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecules*) e as PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules*). Dentre estas destaca-se a ICAM-1, principal ligante que medeia a firme adesão de polimorfonucleares (PMN) à células endoteliais em um processo inflamatório, apresentando, portanto, um importante papel no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. A ICAM-1 é expressa no endotélio em decorrência da ativação desta célula por diferentes mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-1. A ICAM-2, diferente da ICAM-1, é constitutivamente expressa em células endoteliais. A ICAM-3 é expressa principalmente em leucócitos, estando ausente em células endoteliais (revisto em Walzog e Gaehtgens, 2000).

Como explicado acima, as últimas etapas do processo de diapedese são o espalhamento e transmigração dos leucócitos. A PECAM-1, membro da família das imunoglobulinas, é expressa em PMN, monócitos e em células endoteliais, sendo responsável pela migração transendotelial de leucócitos (revisto em Walzog e Gaehtgens, 2000). Esta última etapa ocorre predominantemente nas vênulas pós-capilares e envolve a ação de enzimas proteolíticas dos leucócitos sobre a matriz

extracelular como também o rearranjo do citoesqueleto das células endoteliais (para uma revisão ver Bokoch, 1995).

O pré-requisito para todos estes passos é a ativação das células endoteliais por sinais derivados do tecido que induzem a expressão de moléculas de adesão e disparam a secreção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais. Após ultrapassar a membrana basal, os leucócitos migram quimiotaticamente para seu destino final, um processo originalmente descrito por Rudolf Virchow (revisado em Walzog e Gaehtgens, 2000).

Como mencionado anteriormente, em algum momento durante o processo de adesão do leucócito à parede do vaso, provavelmente em múltiplos pontos, os leucócitos tornam-se ativados. A ativação por quimiocinas (mediadores descritos recentemente, mencionados abaixo), pela interação com as moléculas de adesão ou ainda por outros mediadores, promove a adesão dos neutrófilos e várias outras respostas, incluindo a produção de radicais livres de oxigênio, expressão de outras moléculas de adesão, liberação de metabólitos de lipídios e a secreção de grânulos (Walzog *et al.*, 1994).

Embora a migração de PMN para o tecido e o aumento na permeabilidade vascular ocorram paralelamente no processo inflamatório, estes dois eventos podem ser dissociados. Portanto, é possível ocorrer a passagem de leucócitos através do endotélio sem que ocorra extravasamento, sendo a recíproca verdadeira. Sendo assim, a idéia de que os leucócitos ao migrarem causam soluções de continuidade entre células endoteliais que permitem o extravasamento de líquido é errada. Entretanto, realmente existe uma relação entre leucócitos e permeabilidade endotelial. Recentemente Gautam e colaboradores (2001) demonstraram claramente

que neutrófilos ativados liberam fatores solúveis que, através de uma ação parácrina, estimulam a reorganização ativa do citoesqueleto de células endoteliais adjacentes, conduzindo à formação de fendas intercelulares que levam a um importante aumento de permeabilidade.

1.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Os mediadores são considerados mensageiros químicos capazes de exercer suas ações tanto em vasos como em células, fornecendo, desta forma, subsídios para que o processo inflamatório se desenvolva. Tais moléculas podem atuar independentemente ou ainda de forma conjunta, o que permite haver modulação da resposta inflamatória através de mecanismos de *feedback* positivo ou negativo. Desta forma, estas substâncias químicas podem desempenhar papel tanto de agentes pró-inflamatórios quanto de agentes antiinflamatórios (Laersen e Henson, 1983).

AMINAS VASOATIVAS

Neste grupo encontram-se a histamina e serotonina. Estas duas aminas vasoativas têm papel chave nas fases iniciais do processo inflamatório, sendo capazes de desencadear dilatação de vênulas pós-capilares, com consequente aumento de fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular (Barnes *et al.*, 1988). Estes mediadores parecem ser liberados ao mesmo tempo, e em concentrações em que cada uma destas aminas é capaz de exercer seu máximo efeito na permeabilidade vascular (Di Rosa *et al.*, 1971).

A histamina encontra-se amplamente distribuída nos tecidos, armazenada principalmente no interior de grânulos de mastócitos, células normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos (revisto em Metcalfe *et al.*, 1997). A histamina é liberada pelos mastócitos mediante diversos estímulos físicos ou químicos. Esta amina exerce suas ações biológicas através de receptores específicos H₁ e H₂, e mais recentemente H₃, que tem localização mais restrita a terminações nervosas. A vasodilatação e o extravasamento de líquido em vênulas pós-capilares é mediado essencialmente por receptores H₁ (Barnes, 2001).

A serotonina, assim como a histamina, é um mediador vasoativo pré-formado, que age sobre receptores específicos e apresenta ações semelhantes às da histamina. Encontra-se em plaquetas e células enterocromafínicas e nos mastócitos de roedores, mas não de humanos (Barnes, 2001).

CININAS

As cininas representam um grupo importante de moléculas envolvidas na inflamação. A produção de cininas no sítio inflamatório resulta na vasodilatação, extravasamento plasmático e aderência de neutrófilos em consequência de uma ação direta no endotélio ou indiretamente através da liberação de outras substâncias pró-inflamatórias (para revisão ver Calixto *et al.*, 2000).

As principais cininas envolvidas no processo inflamatório são a bradicinina e a lisil-bradicinina (calidina). São oligopeptídeos (9 e 10 resíduos, respectivamente) formados endogenamente pela clivagem proteolítica do seu precursor, o cininogênio presente na fração α_2 -globulinas das proteínas plasmáticas. Os cininogênios dividem-se em alto (120 kD) e baixo (50 a 68 kD) peso molecular. O cininogênio de

alto peso molecular é substrato da calicreína plasmática enquanto que a calicreína tecidual é capaz de clivar os dois tipos de cininogênios (revisto em Bhoola *et al.*, 1992).

A bradicinina apresenta meia vida-plasmática bastante curta, que varia entre 10 e 50 segundos, dependendo da espécie estudada (Décarie *et al.*, 1996). A clivagem metabólica das cininas é feita por enzimas coletivamente conhecidas como cininases. A bradicinina e a calidina são metabolizadas predominantemente pela cininase II, também conhecida por enzima conversora de angiotensina (ECA; revisto em Erdős, 1990). A ação desta enzima gera metabólitos (BK 1-7 e Lys-BK 1-8) que são desprovidos de ações. Outra classe de cininases, as chamadas cininases I (carboxipeptidases tipo N) formam a des-Arg⁹-bradicinina e a des-Arg¹⁰-calidina, respectivamente. Estes metabólitos apresentam ações fisiológicas.

Os efeitos celulares das cininas são mediados pela ativação de receptores específicos, denominados B₁ e B₂ (revisto em Bhoola *et al.*, 1992). O receptor B₂ é expresso constitutivamente em diversos tecidos e células (revisto em Bathon e Proud, 1991), sendo responsável pela maioria das ações da bradicinina e calidina, ao passo que o receptor B₁ é normalmente ausente em tecidos normais, mas pode ser induzido em processos inflamatórios (revisto em Smith *et al.*, 1995). Os receptores B₂ são ativados pelas cininas intactas enquanto os receptores B₁ são preferencialmente ativados pelos produtos da ação da cininase I na bradicinina e calidina, des-Arg⁹-bradicinina e des-Arg¹⁰-calidina respectivamente (revisto em Menke *et al.*, 1994).

EICOSANÓIDES

Um dos primeiros eventos na resposta inflamatória é liberação do ácido araquidônico (AA), que normalmente encontra-se esterificado à fosfolipídios de membrana, pela ação de enzimas conhecidas como fosfolipases, principalmente a fosfolipase A_2 . Uma vez liberado o AA é convertido a vários compostos biologicamente ativos. Pela ação da enzima ciclooxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina H sintetase, são formadas as prostaglandinas (PG) e os tromboxanos (TX), coletivamente conhecidos por prostanóides. A COX cataliza a oxidação do AA para PGG_2 e subsequente redução para PGH_2 . A PGH_2 é transformada por várias enzimas e também por mecanismos não-enzimáticos em prostanóides primários: PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 e TXA_2 . A COX é, portanto, responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanóides, sendo as etapas posteriores dependentes de enzimas tecido-específicas (revisto em Vane *et al.*, 1998).

O AA é também metabolizado por outras enzimas, conhecidas como lipoxigenases, dando origem a vários outros compostos biologicamente ativos como ao ácido hidroecosatetraenóico (HETES), os leucotrienos (LT; para revisão ver Sigal, 1991) e as lipoxinas (ver MacMahon *et al.*, 2001).

Como derivam de um ácido graxo eicosanóico, os tromboxanos, as prostaglandinas, os leucotrienos e as lipoxinas são coletivamente conhecidos como eicosanóides.

As prostaglandinas, de forma geral, estão envolvidas tanto em condições patológicas como fisiológicas. A COX é encontrada em duas isoformas: a COX-1, enzima constitutiva que medeia importantes funções homeostáticas, como a

manutenção da integridade do epitélio da mucosa gastrointestinal, a função plaquetária, e o fluxo sanguíneo renal (Vane *et al.*, 1998). A outra isoforma é a COX-2 que, na sua forma constitutiva, é encontrada no cérebro e na medula espinhal, onde está envolvida na neurotransmissão, particularmente na dor e febre (Needleman e Isakson, 1997; Vane *et al.*, 1998). Além disso, esta isoforma pode ser induzida em lesões de caráter inflamatório (revisto em Vane *et al.*, 1998).

Os prostanóides são importantes mediadores inflamatórios. Destacam-se as prostaglandinas PGE₂ e a PGI₂, por se apresentarem como potentes agentes vasodilatadores além de potencializarem o aumento de permeabilidade induzido por mediadores como bradicinina e histamina (Williams e Peck, 1977). Além disso, estas PG também estão envolvidos na hiperalgesia por potencializarem os efeitos da bradicinina e histamina (Ferreira, 1972). Os prostanóides exercem seus efeitos através de receptores de superfície de membrana, acoplados a proteína G (Mitchell *et al.*, 1995).

Os leucotrienos também estão envolvidos em diversas reações inflamatórias. São responsáveis pelo aumento de permeabilidade vascular na artéria mesentérica de rato (Leng *et al.*, 1988), pelo extravasamento plasmático em cobaia (Drazen *et al.*, 1980) e em rato (Ueno *et al.*, 1981), além de promoverem Infiltração eosinofílica das vias aéreas em doenças alérgicas (Creticos *et al.*, 1984). Além disso o leucotrieno B₄ é provavelmente o mais potente agente quimiotático produzido pela cascata do AA (para revisão ver Henderson, 1994).

As lipoxinas são formadas a partir do metabolismo iniciado por ações sequenciais das lipoxigenases sobre o AA. A produção de lipoxinas tem sido demonstrada em várias patologias inflamatórias, incluindo asma, glomerulonefrite e

artrite reumatóide (para revisão ver Serhan, 1997). Entretanto, diferente dos demais eicosanóides já mencionados, as lipoxinas apresentam propriedades anti-inflamatórias. Estes lipídios, entre outras propriedades, são capazes de inibir a infiltração de PMN para o foco inflamatório (revisão em Serhan, 1997); inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β ; Hachicha *et al.*, 1999 e IL-6, IL-8; Sodin-Semrl *et al.*, 2000) e estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (Hachicha *et al.*, 1999). Portanto, as lipoxinas contrapõem-se aos efeitos dos demais eicosanóides e de outros mediadores, atuando como verdadeiros “freios” do processo inflamatório. Estes lipídios têm despertado particular interesse devido indicações que compostos sintéticos análogos às lipoxinas possam mimetizar várias das desejáveis ações anti-inflamatórias das lipoxinas endógenas. Devido a acentuada estabilidade e eficácia destes análogos sintéticos, eles tem sido apontados como nova proposta de terapia anti-inflamatória (ver MacMahon *et al.*, 2001).

CITOCINAS

Dentre os principais mediadores da resposta inflamatória destacam-se ainda as citocinas, que estão envolvidas no crescimento e diferenciação celular, na imunidade e no reparo tecidual, além de outras funções (Henderson *et al.*, 1996). As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que atuam de maneira parácrina, autócrina ou endócrina e são consideradas mediadores homeostáticos (Ali *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 1996). As citocinas são classificadas em vários grupos, incluindo as interleucinas (IL), o fator de necrose tumoral (TNF), os interferons (IFN),

os fatores estimuladores de colônia (CSF), os fatores de crescimento e as quimiocinas (Baird *et al.*, 1995; Liles *et al.*, 1995).

Diversos são os estímulos para liberação de citocinas incluindo infecções bacterianas, viroses, parasitoses, micoses, tumores, traumas, estímulos físicos e necrose tecidual (infarto) entre outros. As citocinas parecem ampliar e perpetuar a resposta inflamatória e podem ser importantes na severidade da doença (Liles *et al.*, 1995). Fisiológica e patologicamente, as citocinas apresentam funções complexas, e podem mediar efeitos pleiotrópicos e multifuncionais, dependendo de sua origem e tipo de célula efetora (Galanaud, 1997; Mulligan *et al.*, 1991).

QUIMIOCINAS

As quimiocinas constituem uma grande família de pequenas (8-10 kDa) moléculas solúveis, envolvidas no recrutamento de leucócitos. Exercem seus efeitos através de receptores transmembrana acoplados a proteína G. Atualmente em torno de 50 quimiocinas e 17 receptores para quimiocinas já foram descritos em humanos (Rossi e Zlotnik, 2000, Zlotnik e Yoshie, 2000). A disposição dos dois primeiros pares de cisteínas próximo a extremidade N-terminal divide as quimiocinas em 4 famílias. A família CXC, na qual a IL-8 é a representante mais importante, é caracterizada por apresentar dois conservados resíduos de cisteínas (C), separados por um aminoácido (X). Na família CC, os dois primeiros pares de resíduos de cisteína são adjacentes. Alguns membros mais estudados da família CC incluem MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), RANTES (*regulated by activation, normal T-cell expressed and secreted*) e MIP-1 (*macrophage inflammatory protein-1*). Mais recentemente duas novas famílias de quimiocinas foram descritas. A C-

quimiocina, que apresenta somente dois e não quatro resíduos de cisteína, representada pela linfotactina (Power e Proudfoot, 2001). E a última família, a CXXXC, na qual os pares de resíduos de cisteína são separados por três aminoácidos, representada somente pela fractalcina (para revisão ver Horuk, 2001).

As quimiocinas podem ser encontradas em uma grande variedade de tecidos e ser secretadas por muitos tipos celulares, incluindo leucócitos, células endoteliais e epiteliais. As quimiocinas são, portanto, mediadores pró-inflamatórios responsáveis pelo recrutamento de leucócitos e o desenvolvimento da resposta imune normal. Nos últimos anos, a caracterização dos receptores de quimiocinas e a manipulação farmacológica destes receptores surge como possível alternativa para o controle do processo inflamatório em várias patologias (Power e Proudfoot, 2001).

2. ÓXIDO NÍTRICO

2.1. HISTÓRICO

Em 1981 já se sabia que a excreção de nitrato em ratos mantidos em condições normais ou livre de patógenos excedia a quantidade ingerida pelos animais (Green *et al.*, 1981). Além disso, alguns estudos mostraram que ocorria um significativo aumento na excreção urinária de nitrato em humanos acometidos por febre e diarreia (Wagner *et al.*, 1983). Estas observações sugeriram que, embora a formação de nitrato decorresse do metabolismo de bactérias, células de mamíferos também podiam formar óxidos de nitrogênio e que poderia existir uma correlação entre a síntese de nitratos e a imunoestimulação (Moncada *et al.*, 1991).

No final da década de 70, já havia sido demonstrado o fenômeno de relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina na musculatura lisa

vascular em aorta de coelho (Furchgott e Zawadski, 1980). Este efeito era mediado por um fator humoral, o qual mais tarde foi reconhecido como fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor* ou EDRF; Cherry *et al.*, 1982).

Enquanto a identidade do EDRF permanecia desconhecida, Stuehr e Marletta (1985) mostraram pela primeira vez, utilizando macrófagos de camundongos, a produção de nitrato/nitrito em células de mamíferos *in vitro* em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Estava então demonstrada inequivocamente pela primeira vez a produção de óxidos de nitrogênio em células específicas de mamíferos. Imediatamente começaram a surgir vários trabalhos que implicavam os óxidos de nitrogênio em diversas funções fisiopatológicas. Destaca-se a demonstração feita por Hibbs e colegas (1987) de que a L-arginina era substrato para formação de nitrato e nitrito, e que este evento era necessário para citotoxicidade de macrófagos ativados contra células tumorais.

No calor destas observações, um outro grupo de pesquisadores, composto por Palmer, Ferridge e Moncada, demonstrou que o EDRF e o óxido nítrico (NO) possuíam características biológicas e químicas idênticas, tratando-se portanto da mesma molécula (Palmer *et al.*, 1987). A sugestão de que o EDRF deveria ser o NO, também foi feita um ano mais tarde por um segundo grupo de pesquisadores trabalhando independentemente (Ignarro *et al.*, 1988). Ainda em 1988 o grupo de Moncada mostrou que uma enzima endotelial (denominada NO sintase ou NOS) era responsável pela síntese do NO a partir do aminoácido L-arginina (Palmer *et al.* 1988). Este fato foi prontamente confirmado por diferentes grupos de pesquisa (Marletta *et al.*, 1988; Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr *et al.*, 1989).

A descoberta da formação endógena do NO em mamíferos abriu as portas para milhares de investigações que implicaram o NO, não somente na regulação da fisiologia vascular, mas também na neurotransmissão, na reprodução, nos mecanismos de defesa do hospedeiro e em vários eventos fisiopatológicos (para revisão ver Moncada *et al.*, 1991).

O NO foi uma das maiores descobertas científicas do final do século XX, e todos os aspectos de sua química e biologia vem sendo extensamente estudados. A importância das descobertas acerca do NO, aclamado como “a molécula do ano” em 1992 (Koshland, 1992), rendeu o prêmio Nobel de Medicina de 1998 a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad. Entretanto, Salvador Moncada, um dos pesquisadores responsáveis pelas mais significantes contribuições no campo do NO, foi negligenciado. Moncada e seu grupo, quase uma década após a descoberta do EDRF por Furchgott, foram os primeiros a fornecer evidências diretas e inequívocas que este fator humoral se tratava do NO (Palmer *et al.*, 1987). Adicionalmente, como já mencionado acima, o grupo de Moncada mostrou que a via de biossíntese para geração de NO no sistema cardiovascular era originária do aminoácido L-arginina (Palmer *et al.*, 1988).

2.2. QUÍMICA E ENZIMOLOGIA

O NO é uma molécula relativamente reativa e lipofílica, sendo por esta última característica altamente difusível através de membranas biológicas. Em altas concentrações tem ação citotóxica contra células tumorais e patógenos, enquanto em baixas concentrações atua como molécula sinalizadora em diversos processos

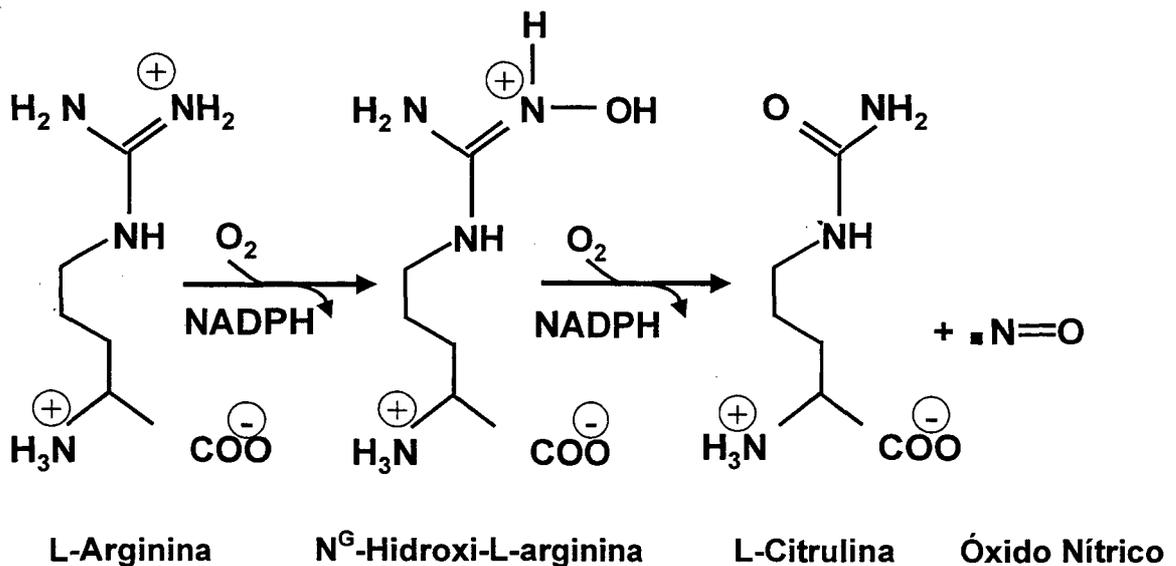
fisiológicos, como neurotransmissão, aprendizagem, memória e regulação do tônus vascular (Crane *et al.*, 1997).

O NO é uma molécula de baixo peso molecular, com um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, o que lhe confere instabilidade química. Apresenta meia-vida de 3-5 segundos em solução aquosa em condições fisiológicas de temperatura, pH e tensão de oxigênio (Ignarro, 1990). Como radical livre, o NO reage rapidamente com outras espécies contendo elétrons desemparelhados como oxigênio molecular, ânion superóxido (O_2^-) e metais (Mayer e Hemmens, 1997). A interação de NO com O_2^- transforma dois radicais livres relativamente pouco reativos em peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante. A formação de peroxinitrito é relatada como evento secundário e paralelo em várias situações patológicas em que grandes quantidades de NO derivado da iNOS (ver abaixo) tem sido identificadas (Daloz *et al.*, 1997).

Em mamíferos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas denominadas NO sintases (NOS) em uma reação que envolve basicamente duas etapas: 1) o primeiro passo envolve a hidroxilação de um átomo de nitrogênio do grupo amino do aminoácido L-arginina gerando um composto estável, a N^G -hidroxi-L-arginina; 2) na próxima etapa, este composto intermediário sofre uma oxidação formando L-citrulina e NO em quantidades equimolares (Esquema 1). A reação completa se dá com a oxidação de 5 elétrons no nitrogênio guanidínico da L-arginina. Esta complexa reação envolve o NADPH e oxigênio molecular como substratos fundamentais, e diversos cofatores, como a tetrahydrobiopterina (THB_4), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e o mononucleotídeo de flavina (FMN). Além disso, a calmodulina, que se liga ao

domínio C-terminal redutase, é essencial para o fluxo de elétrons do domínio redutase para o domínio oxigenase (para revisão ver Crane *et al.*, 1997).

A purificação, caracterização e clonagem das NOS revelaram a existência de três isoformas diméricas como produto de diferentes genes. Estas enzimas tem cerca de 50% de homologia com algumas enzimas do complexo citocromo P450 redutase. As três isoformas diferem na localização subcelular, na sequência de aminoácidos, na sua regulação e no seu papel funcional. A Tabela 1 ilustra as principais características dos três subtipos de NOS.



Esquema 1 – Biossíntese do óxido nítrico (NO) (adaptado de Hemmens e Mayer, 1997).

Duas destas enzimas são expressas de forma constitutiva: a isoforma neuronal (nNOS ou tipo I) e a isoforma endotelial (eNOS ou tipo II), sendo esta forma de classificação baseada no tipo de célula onde estas enzimas foram originalmente

encontradas. A terceira isoforma, denominada iNOS ou tipo III, foi descrita originalmente em macrófagos e, ao contrário das outras duas, só é expressa após a estimulação de diferentes tipos de células (Mayer e Hemmens, 1997).

Os genes que codificam as NOS humanas estão localizados nos cromossomos 7 (eNOS: 21-22 kb, 26 exons), 12 (nNOS: 150kb, 29 exons) e 17 (iNOS: 37kb, 26 exons), e são denominados respectivamente de *nos1*, *nos2* e *nos3* (Mayer e Hemmes, 1997). As três isoformas humanas são encontradas na forma de dímeros quando ativas e apresentam uma sequência de aminoácidos muito semelhante, com homologia de aproximadamente 55% entre si. Possuem regiões conservadas como um domínio C-terminal redutase que apresenta sítios de ligação à calmodulina, FMN, FAD e NADPH e um domínio N-terminal oxidase que contém sítios de ligação para tetrahydrobiopterina, ferro-protoporfirina IX (heme) e o substrato L-arginina. Cada isoforma da NOS apresenta uma extensão diferente do terminal amínico, o qual não é essencial para catálise de NO e provavelmente está relacionada à localização intracelular da enzima (para revisão detalhada ver Griffith e Stuehr, 1995).

Embora a ativação das três isoformas dependa da modificação alostérica causada pela ligação com a calmodulina, que é regulada pela presença de cálcio e a formação do complexo cálcio-calmodulina, apenas a ativação das enzimas nNOS e eNOS ocorre em resposta a elevação na concentração de Ca^{2+} intracelular. A iNOS é capaz de ligar-se à calmodulina com alta afinidade mesmo em baixas concentrações intracelulares de cálcio (para revisão ver Mayer e Andrew, 1998). Estas características fazem com que a atividade da eNOS e da nNOS, mas não da

iNOS, seja modulada diretamente pelas variações nos níveis intracelulares de cálcio (Moncada *et al.*, 1991; Snyder e Brecht, 1992).

Outra importante diferença entre as enzimas constitutivas (eNOS e nNOS) e a enzima induzida (iNOS) está relacionada ao período de produção e a quantidade final de NO gerado por cada uma destas enzimas. Uma vez estimuladas a eNOS e a nNOS permanecem ativas por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), gerando quantidades de NO na ordem de picomolar. Por sua vez, quando expressa, a iNOS libera NO durante longos períodos de tempo (várias horas), produzindo NO na ordem de nano a micromolar.

A expressão da iNOS e consequente produção de altas concentrações de NO está associada com processos inflamatórios localizados ou generalizados e/ou injúria tecidual (para uma revisão ver Morris e Billiar, 1994). Mais especificamente, a sinalização da expressão desta enzima pode ser ocasionada por estímulos como citocinas, fatores tumorais e agentes microbianos (para uma revisão ver Moncada, 1992).

Embora a nomenclatura das isoformas das NOS seja baseada nos tecidos originais onde elas foram originalmente purificadas, hoje se sabe que há uma considerável dispersão da localização das NOS. Assim, a eNOS é encontrada não somente em células do endotélio vascular como também em plaquetas e em certas populações neuronais do cérebro, enquanto a nNOS tem sido igualmente encontrada no epitélio dos brônquios e da traquéia, bem como no músculo esquelético. Além do mais, algumas diferenças tem sido identificadas entre iNOS obtidas de diferentes tecidos das mesmas espécies. Por fim, enquanto a eNOS e a nNOS podem ser induzidas em certas situações como durante exercícios crônicos,

lesões em nervos ou durante a gravidez (quando a iNOS também é induzida), a iNOS parece estar presente constitutivamente em alguns tecidos, incluindo o epitélio brônquico de humanos, os rins de ratos e alguns tecidos fetais (para revisão ver Moncada *et al.*, 1997; Michel e Feron, 1997; Cooke e Dzau, 1997).

Tabela 1 – Características das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS)

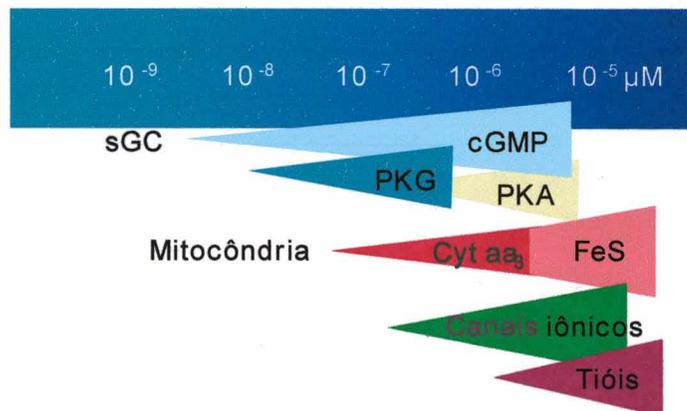
Enzimas Constitutivas (cNOS)		Enzima Induzida (iNOS)
eNOS	nNOS	iNOS
Citosólica ou ligada à membrana	Citosólica	Citosólica ou ligada a organelas
134 kDa	160 kDa	130 kDa
Dependente de NADPH	Dependente de NADPH	Dependente de NADPH
Dependente de THB ₄	Dependente de THB ₄	Dependente de THB ₄
Atividade dioxigenásica	Atividade dioxigenásica	Atividade dioxigenásica
Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina
Dependente de Ca ⁺² /calmodulina	Dependente de Ca ⁺² /calmodulina	Independente de Ca ⁺² /calmodulina
pmol de NO produzido	pmol de NO produzido	nmol de NO produzido
Efeito de curta duração	Efeito de curta duração	Efeito de longa duração
Cromossomo 7	Cromossomo 12	Cromossomo 17
mRNA com 4.4 Kb	mRNA com 10.5 Kb	mRNA com 4 Kb

Adaptado de Hemmens e Mayer, 1997.

2.3. ALVOS MOLECULARES DO ÓXIDO NÍTRICO

Diferente de outros mediadores clássicos, as respostas dependentes de NO não mostram características de saturação típica de mediadores que exercem seus efeitos através de receptores. O NO é um radical livre diatômico que tem seus efeitos determinados por sua reatividade química. A química do NO é complexa, abrangendo numerosas reações potenciais, e sendo o determinante mais importante para ditar o efeito do NO nos sistemas biológicos. Para decifrar esta complexa química e enorme gama de efeitos do NO é importante realçar que suas ações nos sistemas biológicos são dependentes de sua concentração ou diferentes taxas de produção (Esquema 2).

ATIVAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO



Esquema 2– Concentração do NO e ativação das vias de sinalização celular

(Modificado de McAndrew *et al.*, 1997).

Os efeitos do NO são convenientemente classificados em efeitos diretos e indiretos. Efeitos diretos são, por exemplo, reações entre o NO e determinadas moléculas biológicas, como proteínas contendo metais em grupamento prostéticos (por exemplo a própria NOS, a guanilato ciclase e as ciclooxigenases) ou grupamentos tióis, presentes em resíduos de cisteína principalmente. Já os efeitos indiretos correspondem às reações mediadas por intermediários derivados do NO, como as espécies reativas de nitrogênio (RSN) derivadas da reação de NO com O₂ ou ânion superóxido (para uma revisão ver Grisham *et al.*, 1999).

EFEITOS DIRETOS

Os efeitos diretos ocorrem em baixas concentrações ou fluxo de NO. A interação direta do NO com proteínas contendo metal é um dos efeitos diretos do NO mais bem caracterizados em sistemas biológicos.

A reação do NO com certos metais para formar complexos nitrosil ocorre primariamente *in vivo* com proteínas contendo ferro (Wink *et al.*, 1997). A interação do NO com ferro do grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (sGC) e consequente ativação desta enzima, é uma das mais importantes destas reações. O NO reage com o grupamento heme da enzima sGC formando um complexo nitrosil-heme penta-coordenado e que, alterando a configuração do anel porfirínico, é responsável pela indução do estado ativado da enzima, aumentando assim, a conversão de GTP em cGMP (Ignarro *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1984; para revisão ver Ignarro *et al.*, 1994).

Um grande número de compostos endógenos e exógenos, incluindo autacóides, hormônios, neurotransmissores e toxinas induzem respostas celulares

através da produção de cGMP. Este pequeno nucleotídeo cíclico é portanto capaz de mediar uma cascata de sinalização intracelular envolvida na regulação de uma série de processos fisiológicos e patológicos (para revisão ver Lucas *et al.*, 2000).

A guanilato ciclase divide-se em duas isoformas: a guanilato ciclase solúvel (sGC) ativada pelo NO, e a guanilato ciclase particulada ligada à membrana, que não é sensível ao NO. O NO é considerado o principal modulador endógeno da atividade da guanilato ciclase solúvel, e sua capacidade de ativar esta enzima foi demonstrada dois anos antes da descoberta do EDRF (Murad *et al.*, 1978). Além disso, mesmo quando o EDRF não tinha sua identidade definida, a correlação que existia entre aumento nos níveis de cGMP e a vasodilatação induzida por agentes endotélio-independentes, coletivamente denominados "nitrocompostos", possibilitou que Furchgott e colaboradores sugerissem, em 1981, que o acúmulo de cGMP era também o mecanismo envolvido no relaxamento induzido pelo EDRF (Rees, 1991).

A atividade da sGC pode ser inibida diretamente por alteração do estado redox da enzima pelo azul de metileno (Mayer *et al.*, 1993) ou pelo composto LY83583 (Muisch *et al.*, 1988), ou indiretamente através da geração de ânions superóxido. Outros compostos, como o ODQ (1H-(1,2,4)oxidiazolo(4,3-a)quinox-alin-1-ona; Garthwaite *et al.*, 1995) e o seu análogo NS2028 (4H-8-bromo-1,2,4-oxadiazolo(3,4-d)benz(b)(1,4)oxazin-1-ona) inibem a sGC de forma mais potente e seletiva (Olesen *et al.*, 1998). Segundo Schrammel e colaboradores (1996), esta inibição mostrou ser irreversível pela oxidação do grupamento heme desta enzima. Recentemente foi mostrada a existência de compostos capazes de estimular a sGC através de um sítio independente de NO, o que sugere a existência de um novo sítio regulatório para sGC (Stasch *et al.*, 2001).

Embora o alvo efetor do NO mais estudado seja a sCG, onde o NO forma complexos metal-nitrosil, ele pode também exercer seus efeitos diretos através da interação com outras proteínas contendo metais e grupamentos tióis.

O grupamento sulfidríla (-SH) é um alvo importante para efeitos biológicos do NO, podendo a S-nitrosilação representar uma outra via, análoga à fosforilação, para modulação de proteínas (Lane *et al.*, 2001) pela sua propriedade de interagir com grupamentos tióis presentes em locais estratégicos, como o sítio ativo ou o sítio alostérico de proteínas sinalizadoras, receptores, enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição, o NO pode alterar a função destas proteínas (Stamler, 1994). Além disso, a interação do NO com tióis livres proporciona a formação de S-nitrosotióis (RSNO). Os RSNO são considerados verdadeiros reservatórios de NO, pois possuem estrutura muito mais estável (geralmente têm meia vida de horas) e mantêm as mesmas propriedades biológicas deste gás, ao atuarem como doadores endógenos de NO (para uma revisão ver Butler e Rhodes, 1997).

Em células de mamíferos sob condições fisiológicas, os RSNO podem liberar NO^+ e NO^- , formas redox de NO distintas, que exibem variações quanto à reatividade química de outros doadores de NO (Stamier *et al.*, 1992b). A forma oxidada do NO, o NO^+ ou íon nitrosônio, é a responsável pelo grande número de reações eletrofílicas, especialmente a reação de R-SNO. Quimicamente o NO^+ pode ser transferido de um tiol para outro, processo chamado de transnitrosilação. Por outro lado, o NO^- pode resultar da ionização do nitroxil (HNO) (para revisão ver Buther *et al.*, 1995). Os RSNO têm sido identificados em eritrócitos, leucócitos polimorfonucleares, cérebro, plaquetas e plasma (Jia *et al.*, 1996; Giovannoni *et al.*, 1997; Gaston *et al.*, 1998; Gordge *et al.*, 1998; Do *et al.*; 1996).

Como exemplo da importância dos RSNO podemos relatar que recentes pesquisas tem implicado estes compostos no controle da oxigenação dos tecidos através de um processo de transnitrosilação. Neste processo, o NO capturado pelo ferro do grupamento heme da hemoglobina, é transferido intramolecularmente para a cisteína 93 da cadeia β da hemoglobina, produzindo a S-nitrosohemoglobina. Esta etapa ocorre simultaneamente à oxigenação da hemoglobina nos pulmões. Este evento pode ser seguido pela transferência do NO para outra molécula contendo um grupamento tiol, o que permite a liberação de grupos SNOs a partir das células vermelhas. Este processo ocorre preferencialmente em tecidos pobres em oxigênio, onde a desoxigenação da hemoglobina altera sua conformação, mudando da estrutura oxigenada (R, *relaxed*), para estrutura desoxigenada (T, *tense*). A beleza deste processo reside no fornecimento seletivo de NO para tecidos pobres em oxigênio, resultando na dilatação de pequenos vasos com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo durante a oxigenação do tecido. Portanto, a vasoatividade da S-nitrosohemoglobina ocorre na passagem do leito arterial para o venoso durante o processo de transnitrosilação desencadeado pelas mudanças conformacionais da hemoglobina (Jia *et al.*, 1996; Gow e Stamler, 1998).

Recentemente foi demonstrado, em uma elegante série de experimentos conduzidos pelo grupo de Benjamim Gaston, que a habilidade do organismo em aumentar a ventilação de acordo com a quantidade de oxigênio na atmosfera ou a demanda do organismo é, em parte, controlada por S-nitrosotióis atuando no núcleo do trato solitário no sistema nervoso central (Lipton *et al*, 2001). Portanto e de forma notável, os S-nitrosotióis parecem controlar as três partes do ciclo respiratório: i) a

oxigenação da hemoglobina nos pulmões, ii) a liberação de oxigênio para os tecidos e iii) o controle da respiração pelo cérebro.

EFEITOS INDIRETOS

Os efeitos do NO podem ainda ser mediados por espécies reativas de nitrogênio derivadas da interação do NO com oxigênio (O_2) ou com ânion superóxido (O_2^-). Estas espécies reativas de nitrogênio são importantes mediadores de fisiopatologias associadas com diferentes processos inflamatórios (revisto em Nathan, 1997; Grishan *et al.*, 1999; Wink e Mitchell, 1998). As espécies de óxido de nitrogênio mais reativas produzidas *in vivo* são trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). Estes compostos podem induzir estresse nitrosativo e oxidativo respectivamente (para revisão ver Wink e Mitchell, 1998). Embora a oxidação e a nitrosilação possam ocorrer sob condições fisiológicas normais, esses estresses químicos são geralmente associados com situações fisiopatológicas como a inflamação.

O peroxinitrito é um potente agente oxidante, capaz de oxidar grupamentos tióis, nitrar resíduos de tirosina, nitrar e oxidar a guanosina, degradar carboidratos, iniciar peroxidação lipídica e clivar o DNA (para revisão ver Wink e Mitchell, 1998). Estudos com peroxinitrito e doador de peroxinitrito, o SIN-1, mostraram que este composto causa danos em células endoteliais (Katayama, 1995), além de participar de processos inflamatórios, isquemia e/ou injúria tecidual por reperfusão (para revisão ver Muijsers *et al.*, 1997). Em contrapartida, o peroxinitrito parece exercer importante atividade citotóxica contra microorganismos patógenos e células tumorais.

Várias linhas de pesquisa tem também evidenciado que PMN humanos convertem nitrito (NO_2^-), um produto do metabolismo final do NO, nos importantes oxidantes inflamatórios NO_2Cl e $^*\text{NO}_2$ através de um mecanismo dependente da mieloperoxidase (Eiserich *et al.*, 1998). Portanto o NO_2^- parece regular processos inflamatórios através de mecanismos oxidativos, provavelmente por contribuir com a nitração e nitrocloração da tirosina observada em sítios de inflamação e infecção. Além disso, outros trabalhos ilustram a co-localização da iNOS e mieloperoxidase em grânulos primários de neutrófilos (Evans *et al.*, 1996), o que sugere que a formação de NO_2Cl e $^*\text{NO}_2$ através de um processo dependente de NO_2^- em fagolisossomas pode representar um mecanismo de defesa do hospedeiro.

2.4. ÓXIDO NÍTRICO E INFLAMAÇÃO

Nos últimos anos, o papel do NO como mediador inflamatório foi claramente demonstrado, e o número de publicações corroborando este fato cresceu vertiginosamente. Porém, apesar das inúmeras evidências que implicam o NO na fisiopatologia do processo inflamatório, há contradição na literatura a respeito da sua real função. Um grande número de trabalhos demonstram que o NO possui potentes propriedades antiinflamatórias (revisto em Granger e Kubes, 1996), enquanto um número igualmente expressivo de trabalhos mostram que o NO pode promover a inflamação e causar disfunção tecidual (revisto em Wink e Mitchell, 1998).

A controvérsia ainda existente deve-se, provavelmente, às múltiplas ações celulares desta molécula, à quantidade produzida, ao local de produção e ao estado redox do meio onde o NO é liberado.

A formação de NO pode funcionar como uma primeira linha de defesa contra organismos invasores, incluindo parasitas, bactérias e vírus (Nathan e Hibbs, 1991). Os efeitos citotóxicos do NO são a base para a imunidade não-específica contra organismos invasores, mas também podem matar as células do próprio hospedeiro (Hibbs *et al.*, 1988). A concentração local de NO é essencial para determinar sua citotoxicidade. Assim, quantidades picomolares de NO produzido pelas NOS constitutivas são suficientes para sinalização intracelular, enquanto que a concentração na ordem de nano a micromolar gerada pela iNOS apresenta atividade microbicida, além de atuar como agente pró-inflamatório causando uma série de danos ao tecido (revisado em Clancy e Abramson, 1995; Nathan, 1997). Várias evidências implicam o NO em uma série de patologias. Produção excessiva de NO é observada em pacientes com sepse (Moncada e Higgs, 1993), colite ulcerativa (Middleton *et al.*, 1993), psoríase (Kolb-Bachofen *et al.*, 1994), artrite (Farrel *et al.*, 1992) e lúpus eritematoso (Buyon *et al.*, 1994).

Além disso, o NO parece atuar no processo inflamatório modulando e sendo modulado por vários mediadores inflamatórios. Muitas evidências tem apontado para uma interação entre NO e a via das ciclooxigenases. Uma variedade de células podem produzir NO e prostaglandinas simultaneamente em resposta à citocinas ou outros ativadores. Os efeitos parácrinos destas duas classes de moléculas são muitas vezes similares, incluindo a capacidade de relaxar a musculatura lisa e inibir a adesão de plaquetas e neutrófilos. Inicialmente, Kanner e colaboradores (1992), mostraram que a COX podia ser inibida pelo NO provavelmente por ligar-se ao grupamento heme desta enzima. Entretanto, relatos subsequentes mostraram que o NO poderia inibir a COX por interações ainda mais complexas (Tsai *et al.*, 1994).

Contrariamente, vários trabalhos têm mostrado que o NO é capaz de acentuar a síntese de prostaglandinas. (Salvemini *et al.*, 1993; Sautebin e Di Rosa, 1994). Uma possível explicação para esta controvérsia é que, em baixas concentrações, o NO atuaria sequestrando (*scavenging*) o ânion superóxido (O_2^-) prevenindo assim, a redução desta enzima do estado férrico (ativo) para o estado ferroso (inativo). Entretanto, em altas concentrações, como aquelas produzidas pela iNOS, o NO pode ligar-se diretamente ao grupamento heme da COX, inibindo então sua atividade, como descrito por Kanner e colaboradores (1992). Curiosamente, a PGE_2 endógena é capaz de diminuir a produção de mRNA da iNOS estimulado pela IL-1 (Tetsuka *et al.*, 1994). Portanto, as vias do NO e COX parecem interagir de maneira complexa durante uma variedade de processos inflamatórios e fisiológicos.

A contínua liberação de NO pelo endotélio vascular pode representar uma importante função na manutenção da integridade do endotélio vascular em condições fisiológicas e patológicas. O NO pode contribuir para modular o fluxo sanguíneo de vários tecidos e regular a interação entre o endotélio vascular e células inflamatórias circulantes. O NO pode reduzir a agregação plaquetária e a adesão de plaquetas ao endotélio (Radomski *et al.*, 1987) além de inibir a agregação de neutrófilos (Clancy *et al.*, 1992) e adesão de neutrófilos ao endotélio (Kubes *et al.*, 1991; Kubes *et al.*, 1994). Portanto, o NO é capaz de impedir a infiltração de leucócitos no tecido, um requisito no desenvolvimento no processo de inflamação aguda. O NO parece ter ainda papel importante na manutenção da integridade do endotélio vascular, uma vez que o uso de inibidores da NOS causam um aumento da permeabilidade devido a alterações na estrutura do citoesqueleto da célula endotelial (Baldwin *et al.*, 1998).

2.5. ÓXIDO NÍTRICO E CANAIS DE POTÁSSIO

A membrana plasmática de células animais e vegetais possui canais altamente seletivos ao transporte iônico e que conectam o citosol ao exterior celular. Esses canais relacionam-se ao transporte de íons inorgânicos principalmente Ca^{+2} , K^+ , Na^+ e Cl^- , sendo denominados de canais iônicos, cuja função principal é o controle do fluxo iônico essencial para várias funções celulares. Um dos canais iônicos mais amplamente distribuídos são aqueles permeáveis ao K^+ , que podem ser encontrados na membrana plasmática de quase todas as células animais, fundamentalmente mantendo o potencial de membrana. Os canais de K^+ encontrados nas membranas plasmáticas não estão distribuídos de forma aleatória na superfície celular. Alguns canais de K^+ possuem uma sequência de aminoácidos que possibilita sua associação com proteínas de suporte estrutural (*scaffolding proteins*), como as do domínio PDZ (domínios que estabelecem a união de proteínas citosólicas e transmembranares, mediando transduções de sinais mais complexas), resultando no agrupamento daqueles canais em regiões específicas. Nos neurônios, por exemplo, há uma co-localização de canais de Ca^{2+} e canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico (Roberts *et al.*, 1990; Robitaille *et al.*, 1993).

Os canais são importantes para regulação da função celular de células excitáveis e não-excitáveis. Através da sua abertura, eles estabilizam o potencial de membrana, e em células excitáveis tal abertura irá restabelecer o potencial de repouso, repolarizando e portanto finalizando o período do potencial de ação, disparado anteriormente. Em células não-excitáveis, os canais de K^+ também apresentam função importante na regulação do volume celular, transdução de sinal e manutenção do potencial de repouso (Grissmer *et al.*, 1997).

Em geral, a atividade dos canais de K^+ é finamente regulada por controles tecido-específicos como transcrição e ações bioquímicas que influenciam as proteínas do canal. Alguns canais de K^+ são constitutivamente ativos mas a maior parte deles agem transitoriamente, sendo abertos por sinais fisiológicos como neurotransmissores ou segundos mensageiros. Existem pelo menos 4 tipos de canais de K^+ diferentes, classificados de acordo com suas características principais: canais dependente de voltagem (K_V), canais de K^+ retificadores de influxo (*inward rectifier*, K_{IR}), canais de K^+ ATP-dependente (K_{ATP}) e os canais de K^+ dependente de cálcio (K_{Ca}). Estes últimos são ainda classificados de acordo com sua condutância ao potássio. A primeira subclasse refere-se aos canais de alta condutância, também denominados de *Big Channels* (BK_{Ca} ; condutância média de 250 pS). A segunda classe é constituída pelos canais de condutância intermediária (MK_{Ca} ou IK_{Ca} ; condutância média de 60 pS) e a terceira pelos canais de baixa condutância (SK_{Ca} ; condutância média na ordem de 15 pS) (para revisão ver Brayden, 1996; Nilius *et al.*, 1997).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na modulação de canais de potássio por segundos mensageiros, mas eventos de fosforilação e desfosforilação são os mais comuns (Catteral *et al.*, 1991). Além disso, os canais de K^+ podem ser modulados pela interação direta com a proteína G (Yatani *et al.*, 1987), ações de produtos da fosfolipase A_2 (Piomelli *et al.*, 1987) e pela interação direta com cálcio (Dubinky e Oxford, 1985), dependendo da espécie e tecido em estudo.

Recentemente muitas evidências tem mostrado que os canais de K^+ , podem ainda ter sua modulação mediada pelo NO. O NO parece ser capaz de ativar

múltiplos tipos de canais de K^+ (Koh *et al.*, 1995), podendo esta ativação ocorrer de maneira direta (Bolotina *et al.*, 1994), ou através da ativação de proteínas quinases dependentes de cGMP (Archer *et al.*, 1994).

A ativação direta do canal pelo NO possivelmente ocorre através da S-nitrosilação de resíduos críticos de cisteína. A S-nitrosilação pode modificar a estrutura de proteínas por interação direta ou oxidação de tióis vicinais, sendo que ambas as vias de interação afetam a sinalização celular mas levando a diferentes efeitos biológicos. Um exemplo já caracterizado é a S-nitrosilação progressiva que ativa reversivelmente os canais de rianodina sensíveis a liberação de cálcio, enquanto a oxidação de tióis vicinais no mesmo canal causam ativação irreversível (para revisão ver Eu *et al.*, 1999). O mecanismo de ação do NO atuando diretamente em canais iônicos tem sido extensamente estudado, principalmente porque a base bioquímica para esta interação pode levar ao conhecimento de alternativas sobre a sinalização do NO.

OBJETIVOS

Em trabalhos anteriores, nosso laboratório mostrou que a administração de uma única dose de doadores de NO ou uma infusão de 30 minutos com baixas concentrações destes compostos causou alterações de longa duração na reatividade vascular. Como parte da resposta inflamatória é dependente de eventos vasculares, decidimos investigar a influência do tratamento sistêmico com doadores de NO no edema de pata de camundongos induzido por vários estímulos inflamatórios. Para isso os seguintes objetivos foram delineados:

- a) Avaliar a influência de doadores de NO sobre o edema de pata de camundongo induzido por diferentes agentes inflamatórios;
- b) Examinar as possíveis alterações geradas pelos doadores de NO em eventos específicos da resposta inflamatória tais como aumento de permeabilidade plasmática e infiltração de neutrófilos no local inflamado;
- c) Investigar a possível participação da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio nos efeitos do NO.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com 2 a 3 meses de idade (18-25 g) ou ratos Wistar fêmeas com 3 meses de idade (170-220 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) e estão de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH; USA).

3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS

Para mensuração da pressão arterial, os animais foram anestesiados com a combinação de cetamina e xilazina (90 e 15 mg/kg, respectivamente), administrada por via intramuscular e suplementada a intervalos de 45 a 60 min. Após o posicionamento do animal sobre a mesa cirúrgica, a veia femoral esquerda foi localizada para inserção de agulha destinada a administração de heparina, 30 UI, diluída em solução estéril de salina tamponada com fosfatos de acordo com a formulação de Dulbecco (PBS, composição em mM : NaCl 137, KCl 2,7, KH_2PO_4 1,5, NaHPO_4 8,1; pH 7,4), administrada para prevenir coágulos. Em seguida, foi feita traqueostomia (com inserção de cânula) sendo mantida a respiração espontânea. A artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e

tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi feito na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um cateter de polietileno, que foi conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial. Após a manipulação cirúrgica e um período de estabilização de 30 minutos, os animais receberam nitroprussiato de sódio (SNP; 10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c) ou PBS e tiveram sua pressão arterial média avaliada por um período de até 4 h.

3.2.2. EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO

Animais levemente anestesiados com éter receberam na região plantar das patas traseiras direitas (volume de 50 μL), alternativamente, carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$), sulfato de dextrana (200 $\mu\text{g/pata}$), bradicinina (3 nmol/pata), serotonina (10 nmol/pata) ou histamina (100 nmol/pata). As doses dos estímulos inflamatórios foram obtidas da literatura. A pata contralateral (esquerda) recebeu 50 μL de salina estéril tamponada (PBS) e foi usada como controle. Nos experimentos com bradicinina, os animais foram pré-tratados com o inibidor de cininase II, captopril (5 mg/kg , s.c., 1 h antes) a fim de evitar-se a degradação da bradicinina (Corrêa e Calixto, 1993). Todas as substâncias foram dissolvidas em solução salina estéril tamponada (PBS). O desenvolvimento do edema de pata foi medido pletismograficamente, como previamente descrito (Ferreira, 1979), em intervalos de

tempo que variaram dependendo do estímulo inflamatório usado. O sistema usado consiste de uma bomba peristáltica com fluxo constante (0,65 ml/min) conectada a uma cubeta de vidro onde a pata do animal é imersa até a articulação tibio-társica. Após a retirada da pata, a bomba é ligada e mede-se o tempo de reposição do volume deslocado pela pata, em segundos. Graças à uma curva de calibração relacionando-se volumes conhecidos contra tempo de enchimento, o tempo de reposição de líquido pode ser convertido em volume deslocado, fornecendo o edema de pata. A diferença de volume entre a pata traseira direita e esquerda foi quantificada (em μL) e considerada como índice de edema.

A Figura abaixo mostra a curva de calibração utilizando-se este procedimento.

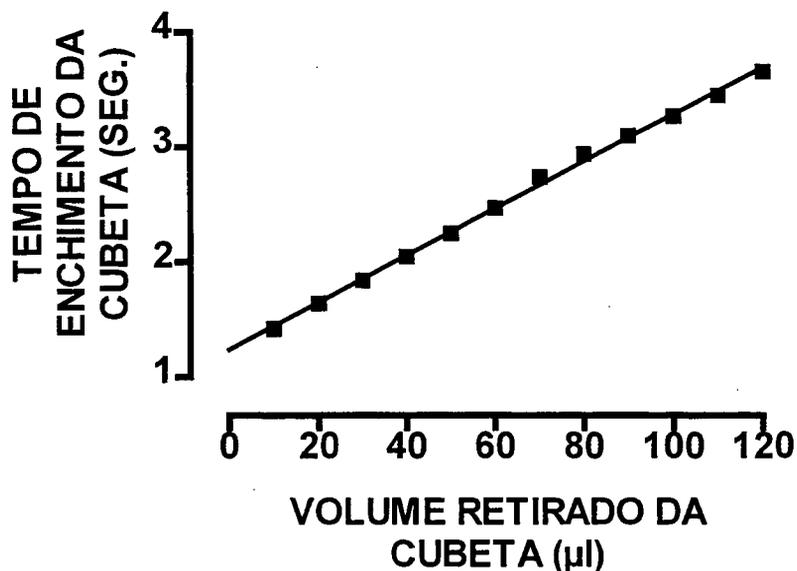


Figura 1: Curva de calibração relacionando volume retirado e tempo de enchimento da cubeta.

3.2.3. EFEITO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO

Para estudar-se a influência do óxido nítrico no edema de pata induzido por vários estímulos inflamatórios, foram usados dois doadores de NO a saber, nitroprussiato de sódio (SNP; nas doses de 1,5, 5, e 10 $\mu\text{mol/kg}$) e S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP; nas doses de 7, 14 e 28 $\mu\text{mol/kg}$) injetados subcutâneamente 24, 12 ou 4 horas antes do estímulo inflamatório. Para excluir algum efeito do SNAP independente do NO, a molécula-mãe não-nitrosilada, a N-acetil-DL-penicilamina (NAP, 14 $\mu\text{mol/kg}$) foi injetada como controle. As doses de SNP foram baseadas na experiência prévia do laboratório (Da Silva-Santos e Assreuy, 1999; Teriuk *et al.*, 2000) e as doses de SNAP foram escolhidas por serem equipotentes, em relação a atividade, às doses de SNP.

3.2.4. AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO POR AZUL DE EVANS NO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO

Como nesta série de experimentos os animais deviam ser sacrificados a cada tempo de determinação do edema para retirada das patas, a análise foi realizada em diferentes grupos de animais a cada período de tempo (30, 60, 120 e 240 minutos após a injeção de carragenina). Alguns grupos foram pré-tratados (4 horas antes da carragenina) com SNP (10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c) enquanto outros receberam PBS. Em seguida, os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de Azul de Evans (80 mg/kg), 1 h antes da injeção de carragenina. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. As patas foram então removidas, cortadas

em pequenos pedaços e incubadas em solução aquosa de formamida (1/1, v/v) por 48 h a 37° C. A densidade óptica do sobrenadante foi medida a 600 nm em um espectrofotômetro (modelo U-2001, Hitachi, Japão). Os resultados foram expressos como a diferença na densidade óptica entre as patas injetadas com PBS e as patas injetadas com carragenina.

3.2.5. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

O recrutamento de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da MPO. Os animais foram pré-tratados com SNP (10 µmol/kg, s.c) 4 horas antes da injeção de carragenina. Duas horas depois da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido subcutâneo da pata foi removido, agrupado (3 patas por tubo), picado e então homogeneizado usando um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, em solução de tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5 %, p/v) por 10 segundos. A solubilização final foi feita usando-se um sonicador (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, EUA) por 10 segundos a 4° C. O homogenato resultante foi então centrifugado (15 min, 10.000 rpm, 4° C) e uma alíquota (25 µL) do sobrenadante foi utilizada para o ensaio da MPO. A reação enzimática desenvolveu-se na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ 0,5 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4) por 5 minutos em um volume final de 150 µL. A absorbância foi medida em um leitor de placa a 650 nm (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). A quantidade de proteína total foi estimada assumindo que 1 mg de proteína ~ 1 unidade de

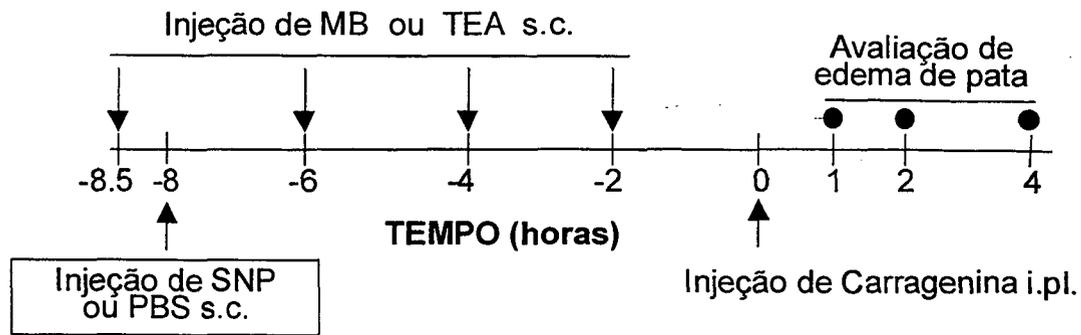
absorbância a 280 nm. A atividade da MPO foi expressa como densidade óptica a 650 nm por mg de proteína.

3.2.6. INIBIÇÃO DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL

Nesta sessão de experimentos, os animais foram pré-tratados com SNP (10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c) 8 h antes da injeção de carragenina. O azul de metileno (AM), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, foi injetado (15,6 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) em grupos de animais 30 min antes ou 2, 4 ou 6 h após a injeção de SNP (portanto 8,5, 6, 4 e 2 horas antes da injeção de carragenina, ver esquema abaixo). Grupos controle foram feitos simultaneamente, sendo os animais tratados somente com SNP, AM ou PBS. O edema de pata foi medido como descrito anteriormente.

3.2.7. BLOQUEIO DE CANAIS DE POTÁSSIO

Para estudar o envolvimento dos canais de K^+ no efeito do NO foi usado um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ , o tetraetilamônio (TEA). O protocolo seguido foi idêntico ao usado acima para avaliação da inibição da guanilato ciclase por azul de metileno no efeito do NO. Portanto, os animais foram pré-tratados com SNP (10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c) 8 horas antes da injeção da carragenina. Diferentes grupos de animais foram então tratados com TEA (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) 30 min antes ou 2, 4 ou 6 horas depois da injeção de SNP (e portanto 8,5, 6, 4 e 2 h antes da injeção de carragenina, ver esquema abaixo). Grupos controle foram feitos simultaneamente, sendo os animais tratados somente com SNP, TEA ou PBS. O edema de pata foi medido como descrito anteriormente.



Esquema 3- Protocolo experimental usado para avaliação da participação da guanilato ciclase e canais de K^+ no efeito do SNP sobre o edema de pata de camundongo.

3.3. COMPOSTOS

Nitroprussiato de sódio, N-acetil-DL-penicilamina, carragenina tipo IV, histamina, bradicinina, serotonina, sulfato de dextrana, tetraetilamônio, azul de metileno, peróxido de hidrogênio, Azul de Evans e hexadeciltrimetilamônio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O SNAP (S-nitroso-DL-penicilamina) foi sintetizado no próprio laboratório pelo método de Field *et al.*, 1978.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de um número (n) de animais que variou entre 4 e 16 por grupo. Para a análise estatística foi usada análise de variância de uma via (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste *t* de Bonferroni ou, quando eram feitas comparações entre dois grupos apenas, o teste *t* de Student para amostras não-pareadas.

RESULTADOS

4.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS

O sistema disponível no laboratório para medida de pressão arterial não permite a utilização para pressão arterial de camundongos, o que tornou impossível determinar os efeitos de doadores de NO diretamente na pressão arterial destes animais. Assim, avaliamos os efeitos do SNP na pressão arterial de ratos como uma aproximação do que deve ocorrer em camundongos. Uma única injeção subcutânea de SNP (10 $\mu\text{mol/kg}$) causou um abrupto decréscimo na pressão arterial média da ordem de 40% em relação ao controle, com pico em 5 minutos (Tabela 2). Este efeito hipotensor desapareceu completamente 1 h após a injeção de SNP. Portanto, assumindo que o efeito do SNP apresenta o mesmo curso temporal em camundongos e como o estímulo inflamatório foi injetado somente 4 horas após o SNP, pudemos excluir qualquer interferência do efeito hipotensor do SNP na resposta inflamatória.

4.2. EFEITO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO NO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGOS

A injeção de SNP 4 horas antes do estímulo inflamatório reduziu, de maneira dose-dependente, o edema de pata causado POR carragenina ou sulfato de dextrana (Figura 2, Painéis A e B, respectivamente; TabelaS 3 e 4). Da mesma forma, o doador de NO da classe dos nitrosotíóis (SNAP), também reduziu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina. Por outro lado, a N-acetil-DL-penicilamina (NAP, o composto-mãe não-nitrosilado do SNAP) foi desprovido de qualquer efeito (Figura 2, Painel C; Tabela 3).

A realização de um estudo tempo-resposta revelou que o efeito inibitório dos doadores de NO esteve presente mesmo quando estes foram administrados 12 h antes do estímulo inflamatório (Figura 3, Painel A; Tabela 5), mas não quando os compostos foram injetados 24 horas antes do estímulo inflamatório (Figura 3, Painel B; Tabela 5).

Considerando que carragenina é um estímulo inflamatório multi-mediado, na sequência avaliamos o efeito dos doadores de NO sobre a ação de alguns mediadores inflamatórios clássicos. A injeção de SNP 4 horas antes do estímulo inflamatório resultou em uma marcante inibição do edema de pata induzido pela bradicinina e histamina (Figura 4, Painéis A e B, respectivamente; Tabela 6; inibição de aproximadamente 50% para ambos mediadores, calculado pela da área sob a curva). Entretanto, o SNP não causou alteração no edema de pata induzido pela serotonina (Figura 4, Painel C; Tabela 6).

Tabela 2 – Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) na pressão arterial de ratos.

	Pressão Arterial Média (mmHg)			
	Tempo após injeção de SNP ou PBS			
	0 min	5 min	60 min	240 min
PBS (controle)	90 ± 1,5	90 ± 1,5	91 ± 1,7	89 ± 2,3
SNP 10 µmol/kg s.c.	91 ± 1,2	53 ± 2,1	86 ± 1,3	92 ± 1,9

Os resultados são expressos como a média ± E.P.M de 4 animais por grupo.

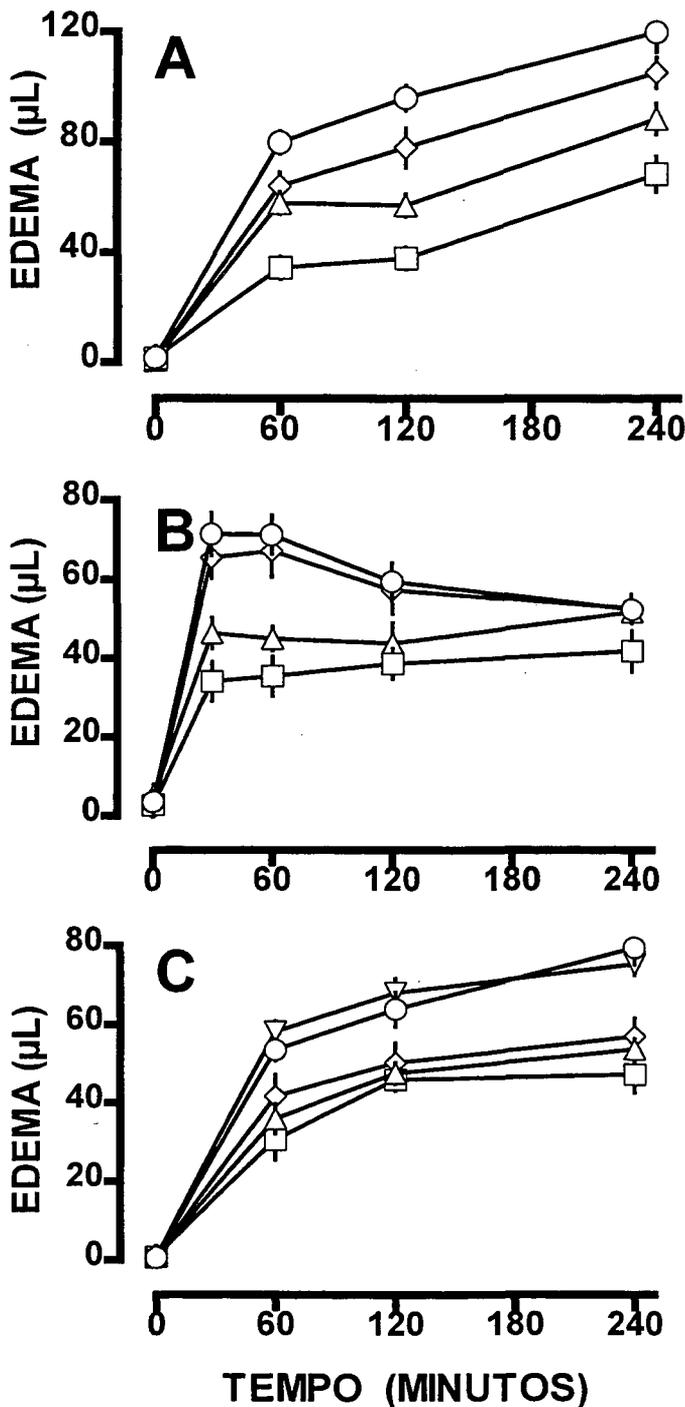


Figura 2 – Efeito de doadores de NO (SNP e SNAP) no edema de pata de camundongo. Painel A: nitroprussiato de sódio 1,5 (losangos), 5 (triângulos) ou 10 µmol/kg (quadrados) ou PBS (círculos) foram injetados s.c. 4 h antes da injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata). O edema de pata foi medido pletismograficamente nos intervalos de tempo indicados. Todas as curvas obtidas em animais pré-tratados com SNP são estatisticamente diferentes em relação aos animais tratados com salina (PBS, círculos; $p < 0,05$) e diferentes entre elas. Painel B: Similar ao Painel A, mas sulfato de dextrana (200 µg/pata) foi usado como agente inflamatório. As curvas obtidas após o pré-tratamento com SNP (injetado s.c. 4 h antes da carragenina; 10 µmol/kg, quadrados; 5 µmol/kg, triângulos) são estatisticamente diferentes da curva controle (PBS, círculos), mas não entre elas. A curva obtida depois do pré-tratamento com SNP na dose de 1,5 µmol/kg não foi diferente da curva controle. Painel C: S-nitroso-acetil-DL-penicilamina 7 (losangos), 14 (triângulos) ou 28 µmol/kg (quadrados) ou N-acetil-DL-penicilamina, 14 µmol/kg (triângulos invertidos) foram injetados 4 h antes da carragenina. Todas as curvas obtidas em animais tratados com SNAP são estatisticamente diferentes da curva controle (PBS, círculos), mas não são diferentes entre elas. A curva obtida com animais tratados com NAP não é diferente da curva controle. Cada ponto representa a média de 8 animais \pm E.P.M. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo test *t* de Bonferroni).

Tabela 3- Efeito de doadores de NO (SNP e SNAP) no edema de pata de camundongo induzido por carragenina.

Pré-tratamento	Dose (μmol/kg)	Edema (μL)		
		60 min	120 min	240 min
PBS	—	79,7 ± 3,20	95,8 ± 4,42	119,7 ± 7,34
	1,5	64,0 ± 4,95	77,9 ± 6,70	105,5 ± 5,42 *
	5	57,9 ± 2,40	57,2 ± 1,38	88,3 ± 5,48 *
SNP	10	34,5 ± 4,39	37,9 ± 3,70	68,5 ± 6,35 *
	—	55,3 ± 2,42	63,7 ± 4,32	79,4 ± 4,20
NAP	14	58,0 ± 2,27	67,9 ± 3,58	75,2 ± 2,54
	7	39,8 ± 3,44	50,0 ± 4,90	56,8 ± 4,52 *
SNAP	14	35,3 ± 3,71	47,3 ± 2,30	53,5 ± 2,32 *
	28	30,5 ± 5,03	45,7 ± 2,83	46,9 ± 4,57 *

SNP, SNAP, NAP ou PBS foram administrados s.c. 4 horas antes da injeção de carragenina (300 μg/pata). Os resultados são expressos como a média ± E.P.M de 8-16 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao controle. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste t de Bonferroni). O asterisco representa a linha toda.

Tabela 4- Efeito do SNP no edema de pata de camundongo induzido por sulfato de dextrana.

Pré- tratamento	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	Edema (μL)			
		30 min	60 min	120 min	240 min
PBS	—	71,3 \pm 5,31	71,2 \pm 4,84	59,3 \pm 4,57	52,2 \pm 2,88
	1,5	65,3 \pm 5,07	67,1 \pm 6,34	57,3 \pm 5,87	52,6 \pm 3,52
SNP	5	46,3 \pm 3,81	44,9 \pm 2,96	43,7 \pm 5,20	51,7 \pm 2,86 *
	10	34,0 \pm 4,91	35,4 \pm 4,98	38,5 \pm 3,71	41,7 \pm 5,11 *

SNP ou PBS foram administrados s.c. 4 horas antes da injeção de sulfato de dextrana (200 $\mu\text{g/pata}$). Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 8-16 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao controle (PBS). (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste t de Bonferroni). O asterisco representa a linha toda.

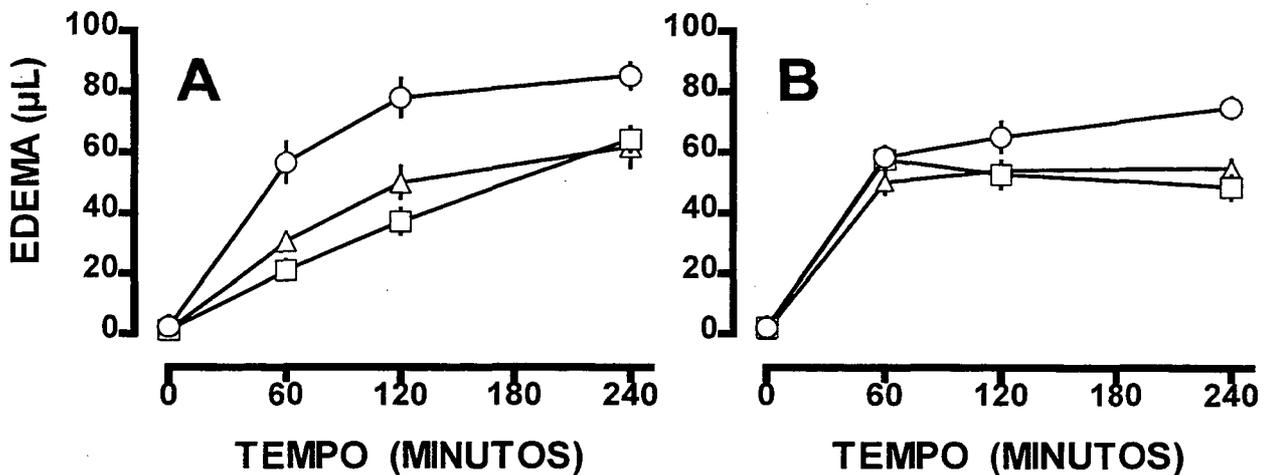


Figura 3: Avaliação do efeito antiedematogênico do SNP administrado 12 ou 24 horas antes da carragenina. Nitroprussiato de sódio 10 (quadrados) ou S-nitrosoacetil-DL-penicilamina 14 $\mu\text{mol/kg}$ (triângulos) ou PBS (círculos) foram injetados s.c. 12 (Painel A) ou 24 horas (Painel B) antes da injeção intraplantar de carragenina (300 $\mu\text{mol/kg}$). O edema de pata foi avaliado por pletismografia nos tempos indicados. No Painel A, as curvas obtidas em animais pré-tratados com SNP 10 $\mu\text{mol/kg}$ (quadrados) ou SNAP 14 $\mu\text{mol/kg}$ (triângulos) são estatisticamente diferentes do controle (PBS, círculos; $p < 0,05$). No Painel B não há diferença estatística entre as três curvas. Cada ponto representa a média de 8 animais \pm E.P.M. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo test *t* de Bonferroni).

Tabela 5- Avaliação do efeito antiedematogênico do SNP administrado 12 ou 24 horas antes da carragenina.

Pré-tratamento	Tempo de injeção antes da carragenina (horas)	Edema (μL)		
		60 min	120 min	240 min
PBS	12	$56,6 \pm 6,53$	$78,0 \pm 6,23$	$85,4 \pm 4,23$
SNP		$21,0 \pm 3,15$	$37,0 \pm 4,22$	$64,4 \pm 4,11$ *
SNAP		$30,6 \pm 3,37$	$50,0 \pm 5,28$	$61,7 \pm 6,74$ *
PBS	24	$58,5 \pm 3,41$	$65,3 \pm 4,89$	$75,1 \pm 3,21$
SNP		$57,7 \pm 3,99$	$52,9 \pm 4,47$	$48,9 \pm 3,99$
SNAP		$50,1 \pm 3,79$	$54,2 \pm 3,07$	$55,1 \pm 2,49$

SNP ($10 \mu\text{mol/kg}$, s.c), SNAP ($28 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou PBS foram administrados 12 ou 24 horas antes da injeção de carragenina ($300 \mu\text{g/pata}$). Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 8-16 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao controle (PBS). (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste t de Bonferroni). O asterisco representa a linha toda.

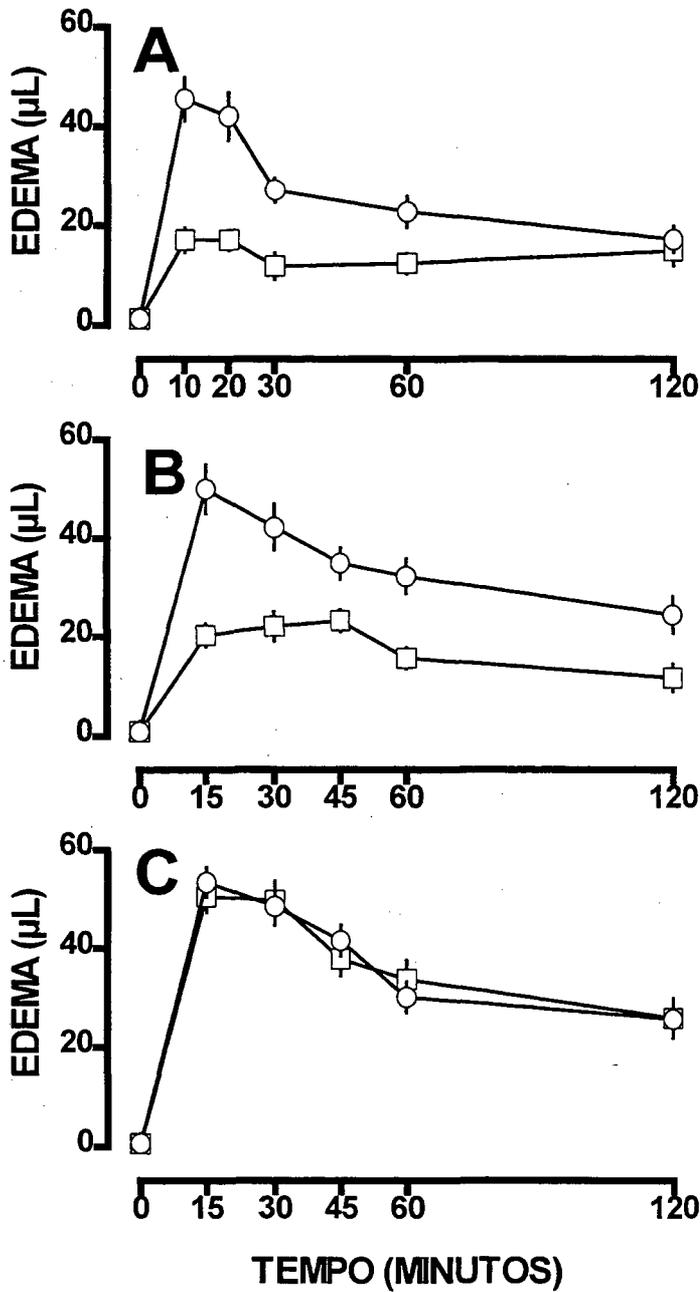


Figura 4 – Efeito do SNP no edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios. Os animais foram tratados com SNP 10 µmol/kg (quadrados) 4 h antes da injeção intraplantar de bradicinina 3 nmol/pata (Painel A), histamina 100 nmol/pata (Painel B) ou serotonina 10 nmol/pata (Painel C). O edema de pata foi avaliado por pletismografia nos intervalos de tempo indicados. Animais que receberam salina (controles) são mostrados em círculos abertos. No Painel A, todos os pontos, exceto o último, são estatisticamente diferente do respectivo controle (PBS, círculos; $p < 0,05$). No Painel B, todos os pontos são estatisticamente diferentes do controle. Cada ponto representa a média de 8 animais \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (círculos). (teste t Student para amostras não-pareadas).

Tabela 6- Efeito do SNP no edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios.

		Mediadores				
Pré-tratamento	Bradicinina (3 nmol/pata)					
	10 min	20 min	30 min	60 min	120 min	
PBS	45,6 ± 4,21	45,2 ± 4,72	27,3 ± 2,46	23,0 ± 3,10	17,4 ± 2,65	
SNP	17,2 ± 2,43	17,2 ± 1,86 *	11,2 ± 2,68 *	12,5 ± 1,83 *	15,3 ± 3,10	
		Histamina (100 nmol/pata)				
		15 min	30 min	45 min	60 min	120 min
PBS		50,0 ± 4,92	42,3 ± 4,61	35,0 ± 3,22	32,3 ± 3,45	24,5 ± 3,65
SNP		20,3 ± 2,29	22,2 ± 2,98 *	23,3 ± 2,24 *	15,8 ± 2,11 *	11,8 ± 2,70 *
		Serotonina (10 nmol/pata)				
		15 min	30 min	45 min	60 min	120 min
PBS		53,5 ± 2,90	48,6 ± 3,91	41,7 ± 3,23	30,3 ± 3,15	25,7 ± 3,33
SNP		50,6 ± 3,21	49,7 ± 3,85	37,9 ± 3,36	33,8 ± 3,68	25,9 ± 3,97

SNP ou PBS foram administrados subcutâneamente 4 horas antes da injeção dos mediadores. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 8-16 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (PBS). (teste t Student para amostras não-pareadas).

4.3. EFEITOS DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NO EXTRAVASAMENTO DE AZUL DE EVANS E NA ATIVIDADE DA MPO

O aumento do volume da pata induzido pela carragenina ocorreu de forma paralela ao processo de exsudação plasmática, verificado através do extravasamento de Azul de Evans. O pré-tratamento com SNP foi capaz de reduzir tanto o edema de pata como a exsudação plasmática (Figura 5, Painel A).

Além do aumento da permeabilidade vascular, a injeção de carragenina induziu a migração de neutrófilos para o tecido, como verificado indiretamente pela avaliação da atividade da MPO (Figura 5, Painel B). O aumento da atividade da MPO 2 h após o estímulo pela carragenina, foi reduzido significativamente (aproximadamente 35%) pelo pré-tratamento com SNP (Figura 5, Painel B).

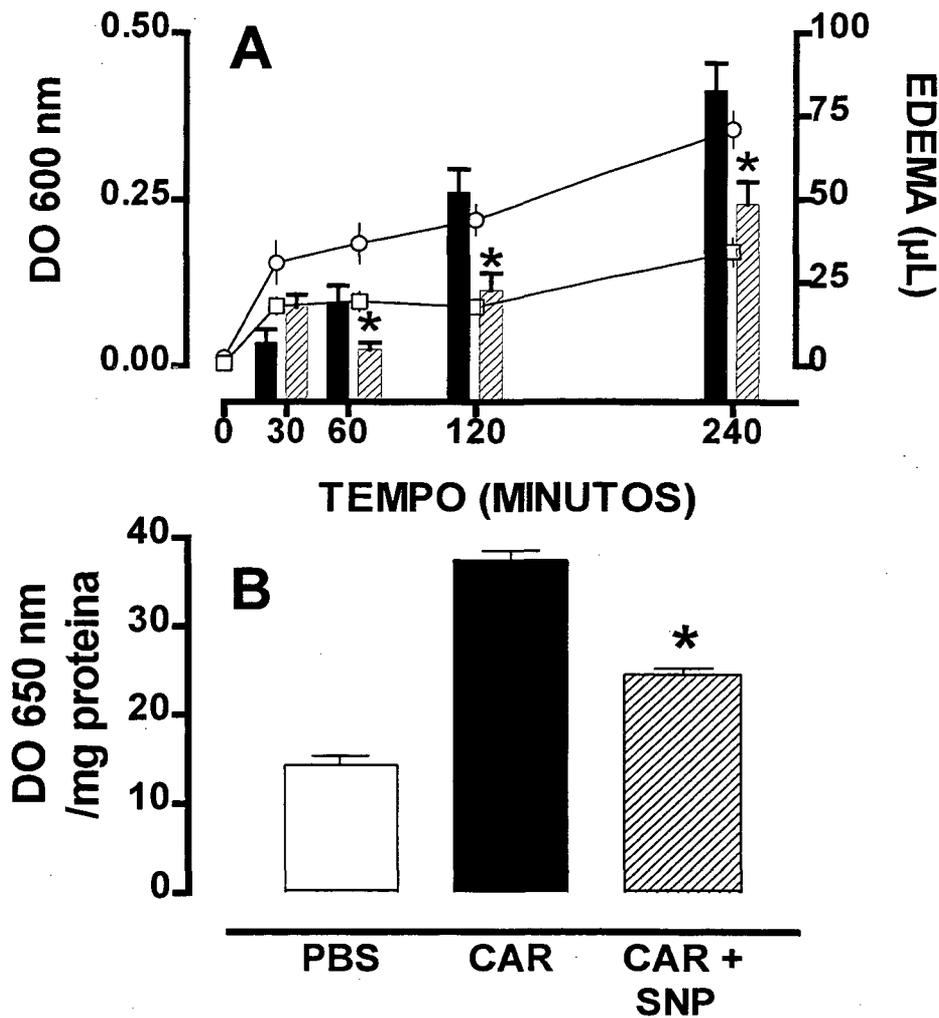


Figura 5: Efeito do nitroprussiato de sódio no extravasamento de Azul de Evans e na atividade da mieloperoxidase. Painel A: Nitroprussiato de sódio (10 µmol/kg, s.c.), foi injetado 4 horas antes da carragenina e, nos tempos indicados, a exsudação de Azul de Evans (barras hachuradas) e o edema de pata (quadrados no gráfico de linhas) foram avaliados. Animais controles receberam PBS (barras negras, círculos). Painel B: atividade da MPO (expressa como densidade óptica a 600 nm/mg de proteína) em animais tratados com nitroprussiato de sódio (barra hachuradas) ou tratados com salina (barra negras) 4 horas antes da injeção de carragenina. Cada ponto representa a média de 8-9 animais \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação aos respectivos grupos controles (círculos e barras abertas) avaliado pelo teste *t* Student para amostras não-pareadas.

4.4. ENVOLVIMENTO DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL E DE CANAIS DE POTÁSSIO NO EFEITO INIBITÓRIO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO NO EDEMA DE PATA DE CAMUNDONGO

Nesta série de experimentos, nós tiramos vantagem da longa duração do efeito inibitório dos doadores de NO no edema de pata (como mostrado na Figura 3, Painel A; Tabela 5). Assim, os animais foram pré-tratados com SNP 8 horas antes da injeção de carragenina. Como era esperado e pode ser verificado na Figura 6 (símbolos quadrados em todos os painéis), este tratamento causou inibição significativa do edema de pata induzido pela carragenina (aproximadamente 50%). Quando o azul de metileno (AM), inibidor clássico da guanilato ciclase solúvel, foi injetado 30 min antes do SNP (e portanto, 8,5 horas antes da carragenina), ele preveniu completamente o aparecimento do efeito inibitório do NO sobre o edema de pata (Figura 6, Painel A; Tabela 7). Um efeito similar do AM foi observado quando ele foi injetado 2 horas após o SNP (isto é, 6 horas antes da carragenina; Figura 6 Painel B; Tabela 7). Por outro lado, quando administrado 4 ou 6 horas depois do SNP (isto é, 4 e 2 horas antes da carragenina), o AM não alterou o efeito inibitório do NO sobre o edema de pata (Figura 6, Painéis C e D; Tabela 7). Quando injetado 2 h antes da carragenina, o AM sozinho não alterou o edema de pata induzido pela carragenina ($66,9 \pm 3,9$ e $68,3 \pm 3,7$ μL , com e sem AM respectivamente, $n = 8$, medido 4 horas após a carragenina).

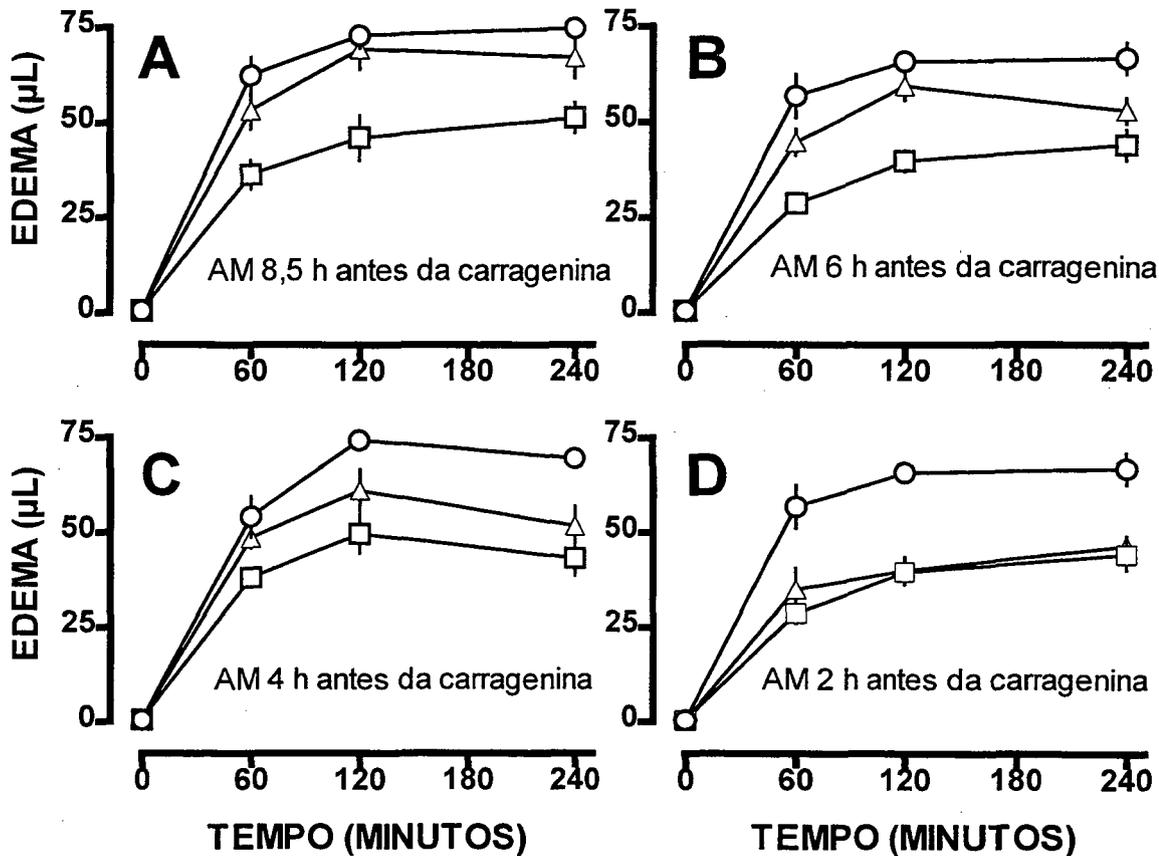


Figura 6: Efeito do azul de metileno (AM) na redução do edema de pata causado por SNP. Os animais foram injetados com nitroprussiato de sódio (SNP; 10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., quadrados) ou PBS (círculos) 8 horas antes da injeção intraplantar de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$). Grupos de 8 camundongos foram injetados com AM (15,6 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) 8,5 horas antes da carragenina (isto é, 30 min antes do SNP; Painel A); 6 horas antes da carragenina (isto é, 2 horas depois do SNP; Painel B); 4 horas antes da carragenina (Painel C) ou 2 horas antes da carragenina (Painel D). O edema de pata foi avaliado por pletismografia nos tempos indicados. Todas as curvas de animais pré-tratados com SNP (quadrados) são estatisticamente diferentes do controle (PBS, círculos; $p < 0,05$). As curvas dos animais tratados com SNP e AM (triângulos) são estatisticamente diferentes dos animais tratados somente com SNP apenas nos Paineis A e B. (Cada ponto representa a média de 8 animais \pm E.P.M. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo test t de Bonferroni).

Tabela 7- Efeito do azul de metileno (AM) na redução do edema de pata causado por SNP.

Pré-tratamento	Tempo de injeção do AM antes da carragenina (horas)	Edema (μL)		
		60 min	120 min	240 min
PBS	—	$57,8 \pm 2,86$	$73,2 \pm 2,58$	$77,7 \pm 5,40$
SNP	—	$34,3 \pm 1,76$	$44,9 \pm 2,70$	$46,3 \pm 2,44$
	8,5	$53,0 \pm 4,80$	$69,3 \pm 5,21$	$67,2 \pm 5,31$ *
SNP	6	$48,6 \pm 3,29$	$61,0 \pm 3,68$	$53,0 \pm 3,29$ *
+				
AM	4	$44,6 \pm 2,15$	$55,0 \pm 5,38$	$51,0 \pm 5,09$
	2	$35,0 \pm 5,62$	$40,0 \pm 3,55$	$46,6 \pm 2,37$

AM ($15,8 \mu\text{mol/kg s.c}$) administrado antes da carragenina nos tempos indicados na tabela. SNP ($10 \mu\text{mol/kg, s.c.}$) ou PBS foram administrados 8 horas antes da injeção de carragenina ($300 \mu\text{g/pata}$). Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 8-24 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com SNP. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste t de Bonferroni). O asterisco representa a linha toda.

A avaliação da participação de canais de potássio no efeito de doadores de NO sobre o edema de pata foi feita pelo uso de tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ . Diferente do azul de metileno, o TEA preveniu completamente o efeito inibitório do nitroprussiato de sódio em todos os pontos de tempo estudados (ou seja 8,5; 6; 4 e 2 horas antes da injeção de carragenina; Figura 7; Tabela 8). Quando injetado 2 horas antes da carragenina, o TEA sozinho não alterou o edema de pata induzido pela carragenina ($66,9 \pm 3,9$ e $60 \pm 3,4 \mu\text{L}$, com e sem TEA respectivamente, $n = 8$, medido 4 h após a carragenina).

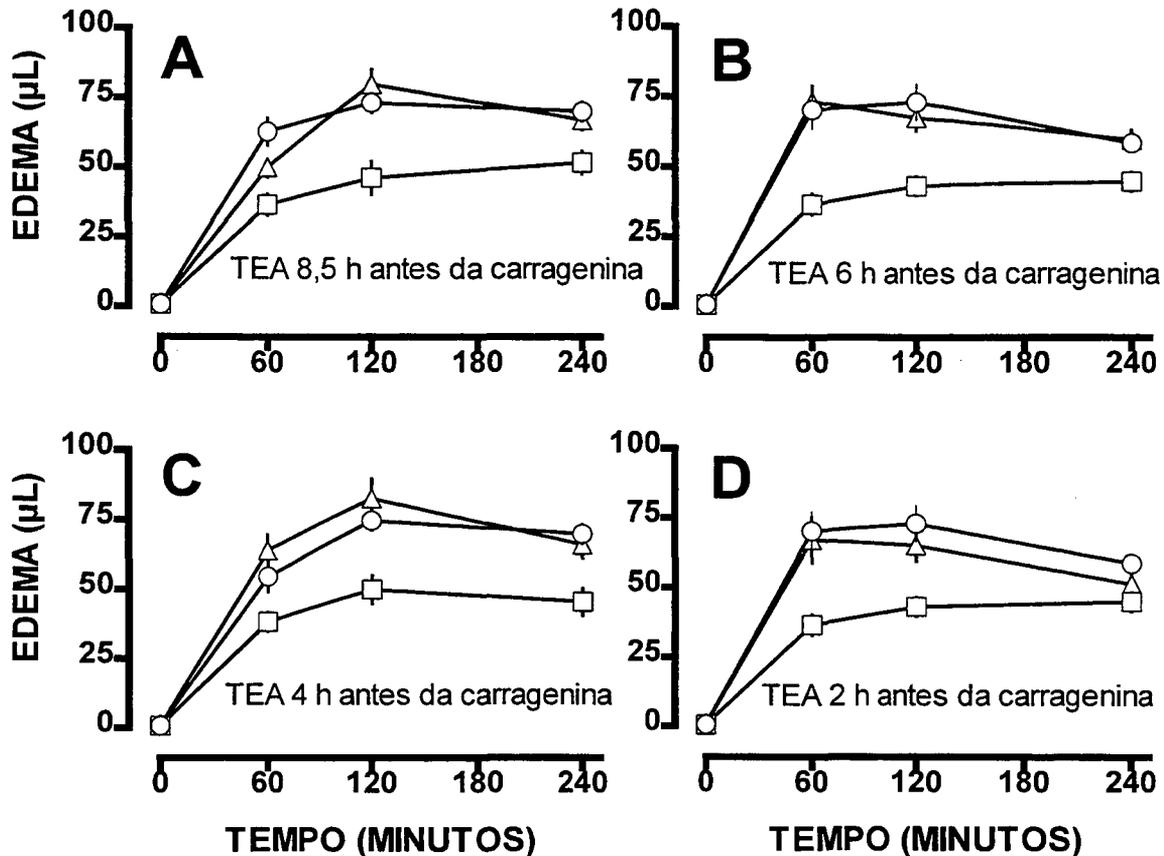


Figura 7: Efeito do tetraetilamônio (TEA) na redução do edema de pata causado por SNP. Os animais foram injetados com nitroprussiato de sódio (SNP; 10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., quadrados) ou PBS (círculos) 8 horas antes da injeção intraplantar de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$). Grupos de 8 camundongos foram injetados com TEA (300 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) 8,5 horas antes da carragenina (isto é, 30 min antes do SNP; Painel A); 6 horas antes da carragenina (isto é, 2 horas depois do SNP; Painel B); 4 horas antes da carragenina (Painel C) ou 2 horas antes da carragenina (Painel D). O edema de pata foi avaliado por pletismografia nos tempos indicados. Todas as curvas de animais pré-tratados com SNP (quadrados) são estatisticamente diferentes do controle (PBS, círculos; $p < 0,05$). As curvas dos animais tratados com SNP e TEA (triângulos) são estatisticamente diferentes dos animais tratados somente com SNP em todos os Paineis. Cada ponto representa a média de 8 animais \pm E.P.M. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo test t de Bonferroni).

YATANI, A.; CODINA, J.; BROWN, A. M.; BIRNBAUMER, L. Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein GK. **Science**, 235: 207-211, 1987.

ZLONTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, 12: 121-127, 2000.

Tabela 8- Efeito do tetraetilamônio (TEA) na redução do edema de pata causado por SNP.

Grupos	Tempo de injeção do TEA antes da carragenina (horas)	Edema (μL)		
		60 min	120 min	240 min
PBS	—	$62,2 \pm 3,47$	$73,3 \pm 2,48$	$65,9 \pm 1,73$
SNP	—	$36,8 \pm 1,87$	$46,0 \pm 2,68$	$47,2 \pm 2,27$
	8,5	$49,6 \pm 3,36$	$79,4 \pm 5,21$	$66,6 \pm 3,01$ *
SNP	6	$73,1 \pm 5,58$	$67,3 \pm 4,47$	$59,9 \pm 2,10$ *
+				
TEA	4	$63,6 \pm 5,5$	$82,2 \pm 6,02$	$65,7 \pm 4,7$ *
	2	$69,0 \pm 6,42$	$68,0 \pm 2,02$	$51,3 \pm 2,4$ *

TEA (300 $\mu\text{mol/kg}$ s.c.) administrado antes da carragenina nos tempos indicados na tabela. SNP (10 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou PBS foram administrados 8 horas antes da injeção de carragenina (300 $\mu\text{g/pata}$). Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 8-16 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado somente com SNP. (ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste t de Bonferroni). O asterisco representa a linha toda.

DISCUSSÃO

O edema de pata de rato induzido por carragenina é um dos modelos mais amplamente usados no estudo de inflamação aguda. A introdução deste modelo em 1962 por Winter, Risley e Nuss foi a base para a descoberta de antiinflamatórios consagrados, como a indometacina (Winter *et al.*, 1963). Graças ao pioneirismo de Massimo Di Rosa, hoje temos bem caracterizadas todas as fases do edema de pata de rato induzido por carragenina, no que se refere aos mediadores envolvidos. Assim, a primeira fase (1-2 h após a injeção de carragenina no coxim plantar) da formação do edema (fase esta que não é inibida por antiinflamatórios não-esteroidais como indometacina ou aspirina) é caracterizada principalmente pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina (Di Rosa *et al.*, 1971). Diferente da fase inicial, a segunda fase do edema (1-4 h após a carragenina) está relacionada com uma elevada produção de prostaglandinas (Di Rosa *et al.*, 1971; Di Rosa e Willoughby, 1971). Quanto ao segmento celular da resposta inflamatória, foi mostrado que a infiltração e ativação de neutrófilos no local da inflamação contribui para o desenvolvimento do processo e consequente formação do edema (Di Rosa e Sorrentino, 1968; Vinegar *et al.*, 1971). Portanto, os neutrófilos são capazes de amplificar este processo principalmente por produzirem prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, como radicais livres de oxigênio (para revisão ver Fantone e Ward, 1982).

Entretanto, a metodologia de edema de pata tem sido pouco usada em camundongos. Levy (1969) introduziu o uso de camundongos em estudos farmacológicos de inflamação aguda e mostrou que nesta espécie, o edema de pata induzido por carragenina apresenta curso temporal similar àquele observado em ratos. Apesar do reduzido número de trabalhos investigando os mediadores

envolvidos no edema de pata induzido por carragenina em camundongos, mostrou-se que, essencialmente os mesmos mediadores estão envolvidos (Campos *et al.*, 1999; Ueno *et al.*, 2000). Além disso, a avaliação de várias drogas antiinflamatórias neste modelo e no edema de pata de rato mostra que elas têm perfil de ação muito similar (Sugishita *et al.*, 1981). Portanto, embora menos explorado que o edema de pata de rato, o edema de pata de camundongo é um modelo muito útil e interessante para o estudo da inflamação (Henriques *et al.*, 1987).

Um modulador importante envolvido em processos inflamatórios agudos e crônicos e de caracterização recente é o NO. Este radical pode ser liberado de células endoteliais em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios, como a bradicinina, histamina e serotonina (ver Appleton *et al.*, 1996). O NO também pode ser formado por macrófagos ativados por LPS ou citocinas (para revisão ver Lyons, 1995). Portanto, o NO pode estar sempre presente no sítio de processo inflamatório em curso.

O papel do NO no edema de pata induzido por carragenina foi primeiramente sugerido em experimentos utilizando inibidores não-seletivos das NOS (L-NMMA ou L-NAME; Ialenti *et al.*, 1992). Estes compostos reduziram o extravasamento e a formação de edema induzidos pela carragenina, sugerindo que a liberação/formação de NO aumentava a resposta inflamatória. Este tipo de resultado formou a base para a atribuição de um papel "pró-inflamatório" ao NO. Como os resultados obtidos com a inibição não-seletiva das NOS foram reproduzidos, pelo menos na fase inicial do edema, na presença de dexametasona (composto capaz de inibir a indução e expressão da iNOS), atribuiu-se importante função à eNOS na formação do edema (Ialenti *et al.*, 1992). Assim, foi sugerido que

o NO derivado da eNOS estimulada por mediadores inflamatórios teria uma importante função de aumentar o fluxo sanguíneo local, conduzindo a um aumento da permeabilidade vascular e conseqüente formação de edema.

No entanto, esta linha de evidência acerca do papel “pró-inflamatório” do NO foi melhor esclarecida por vários trabalhos subsequentes. A redução do edema de pata por inibidores da NOS poderia ser decorrente de um efeito inespecífico, devido a uma diminuição do fluxo sanguíneo na microcirculação da pata (vasoconstrição) sem, entretanto, afetar diretamente a permeabilidade vascular. Esta possibilidade é reforçada por achados mostrando que o efeito inibitório do L-NAME sobre o edema de pata é revertido por vasodilatadores como a prostaglandina E₁ (Teixeira *et al.*, 1993) e iloprost (Franco-Penteado *et al.*, 2001) ou reproduzido por vasoconstritores, como a fenilefrina (Paul *et al.*, 1994).

Em 1991, Paul Kubes, em um trabalho seminal utilizando mesentério de gato mostrou que a administração de L-NAME aumentou a migração de leucócitos para o tecido (Kubes *et al.*, 1991). Um ano mais tarde, este mesmo autor mostrou, contradizendo resultados no edema de pata obtidos por outro grupo (Ialenti *et al.*, 1992), que a inibição da eNOS, além de aumentar o recrutamento de neutrófilos, causava um aumento na permeabilidade vascular (Kubes e Granger, 1992). Como não houve variações no estresse de cisalhamento (*shear stress*), os efeitos obtidos por Kubes não podem ser explicados como sendo conseqüência de uma simples vasoconstrição.

O estudo da participação de qualquer mediador químico em qualquer fenômeno biológico, em geral, restringe-se a remover o dito mediador (geralmente com o uso de um antagonista) e avaliar a conseqüência da falta daquele mediador

no fenômeno em estudo ou então promover, de alguma forma, o aumento da concentração do mediador e avaliar as consequências. No caso do NO, o uso de antagonistas das NOS (e portanto consequente inibição da formação de NO) responde pela imensa maioria dos trabalhos sobre o assunto. O problema central, todavia, é que estes antagonistas não são seletivos e acabam afetando a atividade de NOS não necessariamente relacionadas ao fenômeno em questão, no caso, a resposta inflamatória. Talvez isso explique pelo menos parte da controvérsia na literatura acerca do papel do NO na resposta inflamatória. Em estudos originalmente dirigidos ao papel do NO na hiporresponsividade vascular à vasoconstritores, evento este que é a causa de parcela substancial da morbidade e mortalidade do choque séptico, nosso laboratório iniciou uma linha de experimentação com a demonstração de que uma injeção única ou uma infusão curta de doadores de NO reproduziam, com notável semelhança, este quadro de hiporresponsividade. Como a reação inflamatória depende da resposta vascular a vários mediadores, decidimos avaliar quais as consequências de um aumento transitório nos níveis de NO no decurso da resposta inflamatória e quais os mecanismos pelos quais as ações do NO estariam sendo efetuadas. Para isso, avaliamos os efeitos do pré-tratamento com doadores de NO em um modelo clássico de inflamação aguda, o edema de pata de camundongo.

Uma das vantagens do nosso modelo é que os efeitos do NO na reatividade vascular perduram por períodos prolongados (Da Silva-Santos e Assreuy, 1999). Entretanto, para podermos descartar que qualquer efeito porventura observado pudesse ser causado pelo clássico e importante efeito vasodilatador do NO, avaliamos a pressão arterial de animais ao longo de várias horas após a injeção de

SNP e mostramos que, apesar da queda inicial, a pressão arterial normalizava-se em cerca de uma hora após a injeção do doador. Como a resposta inflamatória foi iniciada 4 horas após a injeção do doador de NO, pudemos descartar qualquer interferência do efeito hipotensor sobre a resposta inflamatória.

Verificamos que o pré-tratamento com SNP claramente causou uma redução dose-dependente do edema de pata induzido pela carragenina. Um perfil de inibição muito semelhante foi obtido quando usamos outro agente capaz de induzir edema, o sulfato de dextrana. O edema de pata induzido por sulfato de dextrana apresenta um padrão diferente do edema induzido por carragenina, não apresentando a segunda fase (3-4 horas pós-tratamento e normalmente associada à produção de prostaglandinas e infiltração de leucócitos). Estes resultados, mostram que o tratamento prévio com NO altera de maneira indiscriminada o curso do processo inflamatório, uma vez que além de diminuir o edema induzido pela carragenina em todos os tempos avaliados foi capaz de reduzir o edema induzido pelo sulfato de dextrana, que apresenta um padrão de resposta diferente da carragenina, como descrito acima. Além disso mostra que não se trata de um efeito inespecífico, uma vez que o SNP apresentou um padrão de inibição dose-resposta, e este efeito é extensivo a diferentes agentes flogísticos (carragenina e sulfato de dextrana).

Utilizando o SNAP, um doador de NO do tipo nitrosotiol e não relacionado estruturalmente com SNP, obteve-se um padrão de inibição de edema similar ao do SNP. Assim, como os dois doadores de NO mostraram um padrão similar de efeito, é pouco provável que os efeitos sejam decorrentes de outra razão que não o NO liberado por eles. Além disso, a administração de N-acetil-DL-penicilamina (NAP), a molécula-mãe não-nitrosilada de SNAP, foi desprovida de qualquer efeito no curso

da resposta inflamatória. Desta forma pode-se afirmar que os efeitos observados são consequência direta da ação do NO na resposta inflamatória.

Diferente do SNP, o efeito redutor de edema de pata causado pelo pré-tratamento com SNAP não apresentou um padrão claro de dependência da dose. Embora não tenhamos explorado em maior detalhe a razão para esta diferença, ela é provavelmente causada pela diferente taxa de liberação de NO pelos doadores. O SNP libera NO muito mais rapidamente que o SNAP ($t_{1/2}$ de liberação de poucos minutos *versus* 2-3 horas, respectivamente; Vaughn *et al.*, 1998). Por esta razão o SNP foi selecionado para continuar este estudo. As doses de SNP foram escolhidas baseadas na experiência prévia de nosso laboratório (Da Silva-Santos e Assreuy, 1999; Teriuk *et al.*, 2000), enquanto as doses de SNAP foram selecionadas para serem equipotentes, em relação a atividade, ao SNP.

Um dado importante no nosso trabalho é que os efeitos do NO estavam presentes quando o SNP foi administrado 4 ou 12 horas antes do estímulo, mas não mais se o doador fosse injetado 24 horas antes do estímulo inflamatório. Portanto o efeito inibitório do NO na resposta inflamatória do edema de pata de camundongo persiste por períodos de tempo imensamente maiores que a meia-vida do próprio NO. Efeitos de longa duração semelhantes a este foram obtidos em nosso laboratório em diferentes modelos (alterações na reatividade vascular, Da Silva-Santos e Assreuy, 1999 e na inibição da proliferação celular, Costa e Assreuy, dados não publicados). Este resultado indica que o NO deve atingir um alvo (ou vários alvos) específico e que a sua ação sobre este alvo inicia modificações na fisiologia celular que são, em última análise, capazes de reduzir a resposta inflamatória e que

persistem por longos períodos de tempo (várias horas), enquanto o NO tem vida extremamente fugaz (alguns segundos).

Assim, nossa hipótese de trabalho é a de que o NO liberado dos doadores dispare eventos que prolongam-se por várias horas após a decomposição dos doadores. Entretanto, nossos resultados, na forma atual, não permitem descartar a possibilidade alternativa que, diferente da primeira, considera que o *próprio* NO seria o mantenedor do prolongado efeito de inibição da resposta inflamatória. Como se sabe, o NO (nas formas de íon nitrosênio, NO^+ ou de óxidos superiores de nitrogênio, como o N_2O_3) tem alta afinidade por grupamentos tióis, presentes principalmente em sulfidrilas de cisteína e outros aminoácidos. Assim, outra explicação para o efeito prolongado do NO seria pela formação de S-nitrosotióis pelo NO derivado do doador injetado. Desde que a existência dos S-nitrosotióis foi demonstrada *in vivo* (Gaston *et al.*, 1993), a importância atribuída a estes compostos vem crescendo. Nesta possibilidade, os nitrosotióis formados pelo NO gerado pelo doador poderiam sofrer clivagem homolítica da ligação S-N, resultando na liberação de moléculas de NO (para revisão ver Stamier, 1994). Assim, os S-nitrosotióis poderiam portanto formar verdadeiros reservatórios de NO, preservando sua bioatividade e prolongando sua meia-vida por várias horas (para detalhes ver Butler e Rodes, 1997).

É conhecido que a resposta inflamatória induzida pela carragenina é mediada por uma grande variedade de mediadores químicos. Para nos certificarmos que o efeito do NO era capaz de afetar estímulos específicos, resolvemos avaliar se o efeito inibitório do NO dar-se-ia também sobre alguns mediadores clássicos do processo inflamatório, tais como bradicinina, histamina e serotonina. Como o NO

reduziu o edema de pata induzido por bradicinina e histamina, conclui-se que o mecanismo (ou mecanismos) pelo qual o NO atua reduzindo a resposta inflamatória parece ser capaz de afetar a resposta desencadeada por diferentes estímulos inflamatórios (carragenina, sulfato de dextrana, histamina e bradicinina). Entretanto, o NO não afetou o edema causado pela serotonina. Embora não tenhamos explorado as razões desta diferença, Kubes e colaboradores mostraram que o aumento de permeabilidade causado por histamina era bloqueado por doadores de NO (Johnston *et al.*, 1999), enquanto que as variações de permeabilidade induzidas pela serotonina não foram alteradas pelo mesmo regime de tratamento com doadores de NO (Gabory *et al.*, 1996). Estes resultados mostram que, embora o NO apresente uma ação geral, sendo capaz de inibir o edema induzido por diferentes estímulos (carragenina, sulfato de dextrana, bradicinina e histamina), novamente sugere que os efeitos inibitórios do NO na resposta inflamatória não decorrem de uma ação inespecífica já que o edema induzido pela serotonina não foi afetado pelo NO.

Especificamente em relação à bradicinina, existem evidências sugerindo que o mecanismo pelo qual o NO diminui os efeitos deste peptídeo pode dever-se ao fato de que o NO diminui a ligação do peptídeo ao seu receptor com consequente diminuição da atividade da proteína G estimulada pela bradicinina (Myamoto *et al.*, 1997). Como tanto o NO como a bradicinina são liberados sob certas condições inflamatórias, o NO poderia funcionar como importante inibidor dos processos mediados pela bradicinina. Estes dados além de serem compatíveis com os nossos resultados, reforçam a idéia que o NO possa atuar diminuindo a resposta inflamatória.

O aumento na permeabilidade vascular levando à formação de edema é um sinal clássico da resposta inflamatória. Como esperado, o estímulo induzido pela carragenina causou um aumento na permeabilidade vascular com consequente escape para o interstício de líquido rico em proteínas, mensurado através do Azul de Evans. Nossos resultados mostram que o pré-tratamento com SNP causou uma redução do extravasamento induzido pela carragenina, perfeitamente paralelo à inibição do edema. Portanto, o NO é capaz de reduzir o aumento da permeabilidade vascular causado pela carragenina com consequente redução do edema de pata. Estes resultados vão ao encontro de trabalhos que mostram que o tratamento com inibidores das NOS causa aumento de permeabilidade vascular (Kubes e Granger, 1992). Embora nós não tenhamos explorado o mecanismo pelo qual o NO reduz a permeabilidade vascular, o relato de que o extravasamento vascular gerado pelos inibidores das NOS é acompanhado por alterações no citoesqueleto das células endoteliais levando a formação de *gaps* interendoteliais que permitem então a passagem de líquido rico em proteínas (Baldwin *et al.*, 1998) sugere que alterações no citoesqueleto devem ser os eventos importantes.

A migração de neutrófilos da circulação para o tecido lesado é um evento crucial durante o desenvolvimento do processo inflamatório. A possibilidade de que o NO poderia estar relacionado com a regulação deste processo passou a ser considerada a partir de trabalhos mostrando que o NO inibia a agregação plaquetária (para revisão ver Hickey e Kubes, 1997). Em 1991, Kubes e colaboradores mostraram que o NO pode atuar fisiologicamente inibindo a adesão de leucócitos ao endotélio. Desde então, a função do NO no recrutamento de neutrófilos tem sido extensamente estudada. A adesão e posterior migração de

neutrófilos para o tecido é um processo complexo que envolve a participação de uma série de moléculas de adesão que desempenham importantes papéis em diferentes tempos do processo de migração. Nos últimos anos, vários trabalhos demonstraram que o NO pode inibir cada um dos múltiplos passos desta cascata de eventos envolvidos no recrutamento de leucócitos. Estes trabalhos mostram que o NO parece inibir a expressão das moléculas de adesão (Kubes *et al.*, 1991; Davenpeck *et al.*, 1994; Gauthier *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1996). Este mecanismo parece ser, ao menos em parte, correlacionado com a redução na ativação do NF- κ B (Peng *et al.*, 1998), um importante fator de transcrição de vários mediadores inflamatórios (revisto em Lentsch e Ward, 1999). Adicionalmente, os doadores de NO parecem ser capazes de diminuir a ativação de células endoteliais induzidas por citocinas (De Caterina *et al.*, 1995). Efeitos do NO agindo diretamente nos neutrófilos e inibindo a agregação destas células através de um processo de ADP-ribosilação também já foram relatados (Clancy *et al.*, 1995). Concordando com estes dados, nossos resultados mostram que o NO reduz a migração de neutrófilos para o tecido. Os neutrófilos, ao migrarem para o tecido, liberam uma série de mediadores químicos capazes de amplificar e prolongar o processo inflamatório. Sendo assim, a infiltração de neutrófilos no tecido contribui significativamente para formação do edema induzido pela carragenina (Di Rosa e Willoughby, 1971). Compostos capazes de impedir a ativação de neutrófilos são capazes de reduzir o processo inflamatório (Pons *et al.*, 1994). Portanto, como parte do edema induzido pela carragenina é neutrófilo dependente, o efeito redutor do NO sobre o edema de pata, deve ser, ao menos em parte, devido a uma redução na migração de neutrófilos para o foco inflamatório.

Existem vários trabalhos mostrando que algumas drogas podem apresentar atividade pró ou anti-inflamatória dependendo da dose usada e da via de administração. Rampart e Williams (1986), por exemplo, mostraram que a prostaciclina pode especificamente exacerbar ou inibir o extravasamento plasmático dependente de PMN, conforme a dose e a via de administração usada. Quando administrada localmente, algumas prostaglandinas potencializam a formação de edema induzido por outros mediadores (Wedmore e Williams, 1981). Entretanto, análogos estáveis de prostaglandinas, quando administrados intravenosamente, em doses que não alteram a pressão sanguínea, inibem o extravasamento plasmático induzido por mediadores dependente de neutrófilos (LTB₄, FMLP), sem afetar a resposta de mediadores que atuam diretamente na permeabilidade microvascular (bradicinina; Pons *et al.*, 1994). Na mesma linha destes achados, foi demonstrado recentemente que inibidores da NOS têm diferentes efeitos na inflamação dependendo da via de administração (Paul-Clark *et al.*, 2001). Esta dualidade de efeitos ajuda a explicar parte da controvérsia existente na literatura a respeito da ação do NO na resposta inflamatória.

Embora não tenha sido explorado no presente trabalho, o papel dos mastócitos na inflamação e as ações do NO sobre este tipo de célula são de grande importância. Os mastócitos são células localizadas nas proximidades dos vasos sanguíneos e capazes de secretar uma variedade de fatores, que atuam tanto no aumento de permeabilidade vascular como no recrutamento de leucócitos. Vários doadores de NO, incluindo nitroprussiato de sódio (SNP) são capazes de diminuir a quantidade de histamina liberada por mastócitos (Salvemini *et al.*, 1991), além de diminuir a produção de PAF (Hogaboam *et al.*, 1993). Adicionalmente, existe um

número crescente de relatos mostrando que a inibição da NOS pode aumentar a migração de neutrófilos por aumentar a reatividade dos mastócitos (Kubes *et al.*, 1993). Portanto se o NO é capaz de prevenir a liberação de mediadores a partir de mastócitos, este processo pode ser importante em prevenir tanto o recrutamento de neutrófilos como o aumento de permeabilidade no processo inflamatório, o que contribuiria para o efeito redutor de resposta inflamatória do NO.

Vários efeitos do NO são mediados através da ativação da guanilato ciclase solúvel e consequente formação de cGMP (Ignarro, 1991), o qual atua em diferentes sítios protéicos intracelulares (para revisão ver Lucas *et al.*, 2000). Nossos resultados demonstram que o efeito inibitório do NO sobre o edema de pata é dependente de cGMP, uma vez que seu efeito foi prevenido por um inibidor clássico da guanilato ciclase solúvel, o azul de metileno (AM). Entretanto, a participação da guanilato ciclase no efeito do NO parece ser importante somente nas primeiras horas após a injeção dos doadores de NO. Depois deste período, a inibição do edema de pata causada pelo NO permanece inalterada mesmo na presença do AM. A falta de efeito do AM em períodos mais tardios em relação a injeção de doadores de NO não pode ser atribuída a uma curta duração da ação desta droga, uma vez que quando ela foi administrada nos tempos mais tardios em relação ao SNP, ela foi efetiva em reverter o efeito deste doador de NO quando administrada em tempos iniciais. Além disso está descrito que o AM apresenta uma meia vida de 5,3 horas (Peters *et al.*, 2000), o que mostra que mesmo o AM injetado nos tempos iniciais esteve presente durante quase todo tempo do experimento. Portanto estes dados sugerem que a inibição da resposta inflamatória causada pelo NO é um evento dependente de cGMP somente no início, mas não em períodos de tempos mais

tardios.

Talvez o mais interessante achado deste estudo, salvo a demonstração do efeito ant-inflamatório de longa duração obtido com uma única injeção de doadores de NO, seja que este efeito inibitório da resposta inflamatória envolve a participação de canais de K^+ . O tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não-seletivo de canais de K^+ , aboliu completamente o efeito redutor de inflamação do NO. Além disso o TEA, de maneira diferente do AM, foi capaz de reverter o efeito do NO mesmo quando injetado em períodos de tempo tardios em relação à injeção de doadores de NO. Estes dados, além de mostrarem que os canais de K^+ estão envolvidos com o efeito do NO no edema de pata, implica os canais de K^+ na longa duração do efeito mediado pelo NO. Embora efeitos inespecíficos do TEA não possam ser descartados, nosso laboratório vem publicando uma série de trabalhos mostrando que mudanças na reatividade vascular induzidas por NO são mediadas, ao menos em parte, por canais de K^+ (Da Silva-Santos e Assreuy, 1999; Terluk *et al.*, 2000; Da Silva-Santos *et al.*, 2002). Da mesma forma, estes canais parecem mediar a inibição irreversível da proliferação de linhagens de células tumorais murinas causada pelo NO (Costa e Assreuy, dados não publicados). Juntos, estes dados mostram que os canais de K^+ parecem ser importantes intermediários de alguns efeitos do NO, especialmente quando estes efeitos são de longa duração.

Nos últimos anos foi demonstrado que o NO é capaz de ativar canais de K^+ diretamente (possivelmente por nitrosilação de sulfidrilas críticas; Bolotina *et al.*, 1994), ou via cGMP (possivelmente por fosforilação do canal através da ativação de proteína quinase dependente de cGMP; Archer *et al.*, 1994). Entretanto, até o presente momento não temos evidências que apontem qual mecanismo seria

relevante em nosso modelo.

A descoberta da via L-arginina-NO revelou que o NO é o componente ativo de um grupo de drogas conhecidas como nitrovasodilatadores, usados há muitos anos na clínica para diminuir a pressão sanguínea e aliviar ataques de angina. Inúmeros trabalhos tem mostrado que o NO apresenta efeito protetor em várias patologias inflamatórias do sistema cardiovascular, tais como aterosclerose, isquemia-reperfusão e choque circulatório (Boughton-Smith, 1990; Lefer *et al.*, 1993; Candipan *et al.*, 1996). Animais *knockout* para eNOS apresentam um processo acentuado de aterosclerose, além de desenvolverem lesões mais extensas em modelos de isquemia e reperfusão (Jones *et al.*, 1999; Knowles *et al.*, 2000). Além disso, a redução da biodisponibilidade do NO tem sido apresentada como fator de risco para aterosclerose (Quyyumi *et al.*, 1995). Portanto, diante destes achados, e a luz de nossos resultados, podemos sugerir que os nitratos orgânicos e doadores de NO além de melhorarem a perfusão sanguínea, talvez reduzam também o processo inflamatório associado a estas patologias. Adicionalmente, tem se mostrado que, em situações do tipo isquemia-reperfusão, o NO inalado, além de melhorar a perfusão, inibe o recrutamento de neutrófilos e a disfunção microvascular (Fox-Robichaud *et al.*, 1999). Portanto, é claro que o uso judicioso de NO pode desempenhar papel relevante na diminuição do quadro inflamatório.

Os antiinflamatórios não-esteroidais representam uma das classes de agentes terapêuticos mais amplamente usada. Entretanto, estes fármacos podem causar úlcera e hemorragia gastrointestinal. Na última década tem-se mostrado claramente que o NO pode atuar na prevenção e reparo de lesões gastrointestinais, mostrando-se benéfica a associação de antiinflamatórios não-esteroidais ao NO

(para revisão ver Muscará e Wallace, 1999). Várias estratégias para co-administração de NO e antiinflamatórios clássicos têm sido empregadas com sucesso (Wallace *et al.*, 1994). Diante dos nossos resultados, podemos sugerir que esta associação pode trazer mais benefícios do que o esperado, pois o NO além de atuar prevenindo lesões na mucosa gástrica pode atuar sinergicamente com os antiinflamatórios não-esteroidais diminuindo o processo inflamatório.

Em resumo, o presente estudo demonstra que uma única injeção de doadores de NO exerce um importante efeito antiinflamatório evidenciado pela redução da permeabilidade vascular e da infiltração de neutrófilos, efeito este estudado no modelo de edema de pata de camundongo. Este efeito de redução da inflamação é de longa duração, persistindo por períodos de tempo muito superiores à meia-vida do próprio NO. Este efeito é dependente de cGMP, nas primeiras horas após a injeção de doadores de NO, e de canais de K^+ , durante todo o tempo de análise. Portanto o efeito de longa duração do NO parece estar estreitamente relacionado com a ativação de canais de K^+ . Permanece para ser determinado se a ativação de canais de K^+ é um evento da ação direta do NO sobre o canal, ou se é decorrente da ativação da guanilato ciclase. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta atividade antiinflamatória de longa duração do NO pode prover novas direções para o controle de desordens inflamatórias.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R. Mechanism of inflammation and leukocyte activation. **Adv. Rheumatol.**, 81: 1-27, 1997.
- APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Adv. Pharmacol.**, 35: 27-75, 1996.
- ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.; NELSON, D.P.; SHULTZ, P.J.; WEIR, E.K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of charybdotoxin-sensitive K channels by cGMP-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 7573-7587, 1994.
- BAIRD, P.N.; D'ANDREA, R.J.; GOODALI, G.J. Cytokine receptor genes: Structure, chromosomal location, and involvement in human disease. **Leuk. Lymphoma**, 18: 373-383, 1995.
- BALDWIN, A.L.; THURSTON, G.; NAEMI, H.A. Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton. **Am. J. Physiol.**, 274: H1776-1784, 1998.
- BARNES, P.J.; CHUNG, K.F.; PAGE, C.P. Inflammatory mediators and asthma. **Pharmacol. Rev.**, 40: 49-84, 1988.
- BARNES, P.J. Histamine and Serotonin. **Puim. Pharmacol. Ther.**, 14: 329-339, 2001.
- BATHON, J.M.; PROUD, D. Bradykinin antagonists. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 31: 129-162, 1991.
- BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, 15: 74-80, 1994.
- BEVILACQUA, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Ann. Rev. Immunol.**, 11: 767-804, 1993.
- BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M.; MANNORI, G.; Cecconi, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Ann. Rev. Medicine**, 45: 361-378, 1994.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens and Kininases. **Pharmacol. Rev.**, 44: 1-80, 1992.
- BOKOCH, G.M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, 86: 1649-1660, 1995.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 362: 850-853, 1994.

- BOUGHTON-SMITH, N.K.; HUTCHESON, I.R.; DEAKIN, A.M.; WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S. Protective effect of S-nitroso-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 191: 485-488, 1990.
- BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**, 23: 1069-1076, 1996.
- BROIDE, D.H. Inflammatory cells: Structure and function. Em: **Basic and Clinical Immunology**, STITES, D.D. & TERR, Al. (ed). Applenton and Lange.p. 141-183, 1991.
- BROW, E.J.; GOODWIN, J.L. Characterization of the Arg-Gly-Asp bindings proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **J. Exp. Med.**, 167: 777-780, 1988.
- BUTLER, A.R.; FLITNEY, F.W.; WILLIAMS, D.L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. **Trends. Pharmacol. Sci.**, 16: 293, 1995.
- BUTLER, A.R.; RHODES, P. Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. **Anal. Biochem.**, 249: 1-9, 1997.
- BUYON, J.P.; SELIGMAN, S.; CLANCY, R.; BELMONT, H.M.; YOUNG, B.; ABRAMSON, S.B. Increased serum nitrite levels in lupus pregnancies. **Arthritis Rheum.**, 37: S324, 1994.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: kinins in pain and inflammation. **Pain.**, 87: 1-5, 2000.
- CAMPOS, R.O.; ALVES, R.V.; FERREIRA, J.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY. S.; MAVUNKEL, B.J.; CALIXTO, J.B. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. **Naunyn Schmiedbeg's Arch. Pharmacol.**, 360: 278-286, 1999.
- CANDIPAN, R.C.; WANG, B.Y.; BUITRAGO, R.; TSAO, P.S.; COOKE, J.P. Regression or progression: dependency on vascular nitric oxide. **Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol.**, 16: 44-50, 1996.
- CATTERALL, W.A.; SNUTCH, T.P.; THOMSEN, W.; ROSSIE, S. Structure and modulation of voltage-gated ion channels. **Ann. NY Acad. Sci.**, 625: 174-180, 1991.
- CHERRY, P.D.; FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 79: 2106-2110, 1982.

- CLANCY, R.M.; LESZCZYNSKA-PIZIAK, J.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J. Clin. Invest.**, 90: 1116-1121, 1992.
- CLANCY, R.M.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 210: 93-101, 1995.
- COHNHEIM, J. Lectures on general pathology. In **A handbook for practitioners and students**. The New Sydenham Society, London, 1889.
- COLLINS, T. Adhesion molecules in leukocyte emigration. **Scientific American (Science & Medicine)**, 2: 28-37, 1995.
- COOKE, J. P.; DZAU, V.J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Ann. Rev. Med.**, 48: 489-509, 1997.
- CORREA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 193-198, 1993.
- COTRAN, R.S.; MAJNO, G. The delayed and prolonged vascular leakage in inflammation. I. Topography of the leaking vessels after thermal injury. **Am. J. Pathol.**, 45: 261-281, 1964.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. In: Cotran, R.S.; Kumar, V.; Robbins, S.L. **Pathologic Basics of Disease**. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, p.51-92, 1994.
- CRANE, B.R.; ARVAI, A.S.; GACHHUI, R.; WU, C.; GHOSH, D.K.; GETZOFF, E. D.; STUEHR, D. J.; Tainer, J. A. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. **Science**, 278: 425-431, 1997.
- CRETICOS, P.S.; PETERS, S.P.; ADKINSON, N.F.; NACLERIO, R.M; HAYES, E.C.; NORMA, P.S.; LCHTENSTEIN, L.M. Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed. **New. Engl. J. Med.**, 310: 1626-1630, 1984.
- DALLOZ, F.; MAUPOIL, V.; LECOUR, S.; BRIOT, F.; ROCHETTE, L. *In vitro* studies of interactions of NO donor drugs with superoxide and hydroxyl radicals. **Mol. Cell. Biochem.**, 177:193-200, 1997.
- DA SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 290: 380-387, 1999.
- DA SILVA-SANTOS, J.E.; TERLUK, M.R.; ASSREUY, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced

- hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock**, 17: 70-76, 2002.
- DAVENPECK, K.L.; GAUTHIER, T.W.; LEFER, A.M. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. **Gastroenterology**, 107: 1050-1058, 1994.
- DAVIDSON, J. M. Wound repair. Em: Gallin, J. I. Goldstein, I.M. & Snyderman, R. (ed). **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Raven Press Ltda. p. 809-817, 1992.
- DÉCARIE, A.; RAYMOND, P.; GERVAIS, N.; COUTURE, R.; ADAM, A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]-BK: influence of enalaprilat. **Am. J. Physiol.**, 270: H1340-H1347, 1996.
- DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B.; THANNICKAL, V.J.; RAJAVASHISTH, T.B.; GIMBRONE Jr, M.A.; SHIN, W.S.; LIAO, J.K. Nitric oxide decrease cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, 96: 60-80, 1995.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, 104:15-29, 1971.
- DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **Eur. J. Pharmacol.**, 4: 340-343, 1968.
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for antiinflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, 23: 297-300, 1971.
- DO, K.; BENZ, B.; GRIMA, G.; GUTTECK-AMSLER, U.; KLUGE, I.; SALT, T. Nitric oxide precursor arginine and S-nitrosoglutathione in synaptic and glial function. **Neurochem. Int.**, 29:213-224, 1996.
- DRAZEN, J.M.; AUSTEN, K.F.; LEWIS, R.A.; CLARK, D.A.; GOTO, G.; MARFAT, A.; COREY, J. Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D *in vivo* and *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77: 4354-4358, 1980.
- DUBINSKY, J.M.; OXFORD, G.S. Dual modulation of potassium channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 9659-9663, 1985.
- EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, B.; VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, 391: 393-397, 1998.

- ERDÖS, E.G. Some old and some new ideas of kinin metabolism. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 15: S20-S24, 1990.
- EU, P.J.; XU, L.; STAMLER, J.S.; MEISSNER, G. Regulation of Ryanodine receptors by reactive nitrogen species. **Biochem. Pharmacol.**, 57: 1079-1084, 1999.
- EVANS, T.J.; BUTTERY, L.D.K.; CARPENTER, A.; SPRINGALL, D.R.; POLAK, J.M.; COHEN, J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 9553-9558, 1996.
- FANTONE, J.C; WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, 107: 397-418, 1982.
- FARREL, A.J.; BLAKE, D.R.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. **Ann. Rheum. Dis.**, 51: 1219-1228, 1992.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandin, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, 240: 200-203, 1972.
- FERREIRA, SH. A new method for measuring variations of rat paw volume. **J. Pharmacol.**, 31: 648, 1979.
- FIELD, L.; DILTS, R.V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P.G.; CARNAHAN, G.E. An unusually stable thionitrit from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.**, 249-250, 1978.
- FRANCO-PENTEADO, C.F.; DESOUSA, I.; TEIXEIRA, S.A.; RIBEIRO-DASILVA, G.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. **Biochem. Pharmacol.**, 61: 1305-1311, 2001.
- FOX-ROBICHAUD, A.; PAYNE, D.; HASAN, S.U.; OSTROVSKY, L.; FAIRHEAD, T.; REINHARDT, P.; KUBES, P. Inhaled NO as viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. **J. Clin. Invest.**, 101: 2497-2505, 1998.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 372-376, 1980.
- GABOURY, J.P.; NIUX, X-F; KUBES, P. Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. **Circulation**, 93: 318-326, 1996.
- GALANAUD, P. Les cytokines du système de défense. Em: cytokines et médecine interne. GALANAUD, P; ÉMILE, D (eds), Paris: Masson, pp:1-255, 1997.

- GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates.**, New York: Raven Press, 1992.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48: 184-188, 1995.
- GASTON, B.; REILLY, J.; DRAZEN, J. M.; FACKLER, J.; RAMDEV, P.; ARNELLE D.; MULLINS, M. E.; SUGARBAKER, D. J.; CHEE, C.; SINGEL, D. J. et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 10957-10961, 1993.
- GASTON, B.; SEARS, S.; WOODS, J.; HUNTS, J.; PONAMAN, M.; MCMAHON, T.; STAMLER, J. Bronchodilator S-nitrosothiol deficiency in asthmatic respiratory failure. **Lancet**, 351: 1317-1319, 1998.
- GAUTAM, N.; OLOFSSON, A.M.; HERWALD, H.; IVERSEN, L.F.; LUNDGREN-AKERLUND, E.; HEDQVIST, P.; ARFORS, K.E.; FLODGAARD, H.; LINDBOM, L. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. **Nat. Med.**, 7: 1123-1127, 2001.
- GAUTHIER, T.W.; DAVENPECK, K.L.; LEFER, L.M. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol.**, 267: G562-568, 1994.
- GIOVANNONI, G.; LAND, J.; KEIR, G.; THOMPSON, E.; HEALES, S. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. **Ann. Clin. Biochem.**, 34: 193-198, 1997.
- GORDGE, M.P.; ADDIS, P.; NORONHA-DUTRA, A.; HOTHERSALL, J.S. Cell-mediated biotransformation of S-nitrosoglutathione, **Biochem. Pharmacol.**, 55: 657-665, 1998.
- GOW, A.J.; STAMLER, J.S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. **Nature**, 391: 169-172, 1998.
- GRANGER, D.N.; KUBES, P. Nitric oxide as anti-inflammatory agent. **Methods Enzymol.**, 369: 434-442, 1996.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, 212: 56-8, 1981.
- GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Ann. Rev. Physiol.**, 57: 707-736, 1995.

- GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUOIL, D.; WINK, D.A. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **Am. J. Physiol.**, 276: G315-G321, 1999.
- GRISMER, S. Potassium channels still hot. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18: 347-350, 1997.
- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. Em: **Mediators of inflammation**. Haanen, C; Vermes, I (eds), Oxford, London: Rapid Communications of Oxford Ltd., :5-15, 1995.
- HACHICHA, M.; POULIOT, M.; PETASIS, N.A.; SERHAN, C.N. Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1 α -initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. **J. Exp. Med.**, 189: 1923-1930, 1999.
- HELLEWEL, PG. Cell adhesion molecules and potential for pharmacological intervention in lung inflammation. **Pulm. Pharmacol.**, 6: 109-118, 1993.
- HEMMENS, B.; MAYER, B. Enzymology of nitric oxide synthases. **Meth. Mol. Biol.**, 100: 1-32, 1997.
- HENDERSON, B.; POOLE, S.; WILSON, M. Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network? **Immunopharmacol.**, 35: 1-21, 1996.
- HENDERSON JR, W.R. The role of leukotrienes in inflammation. **Ann. Intern. Med.**, 121: 684-697, 1994.
- HENRIQUES, M.G.; SILVA, P.M.; MARTIN, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Res.**, 20: 243-249, 1987.
- HIBBS, J.B.JR.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Sci. Wash. DC**, 235: 437-476, 1987.
- HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 1587: 87-94, 1988.
- HICKEY, M.J.; KUBES, P. Role of nitric oxide in regulation of leukocyte-endothelial cell interactions. **Exp. Physiol.**, 82: 339-348.
- HOGABOAN, C.M.; BEFUS, A.D.; WALLACE, J.L. Modulation of rat mast cell reactivity by IL-1 beta. Divergent effects on nitric oxide and platelet-activating factor release. **J. Immunol.**, 151: 3767-3774, 1993.

- HORUK, R. Chemokine receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 12: 313-335, 2001.
- IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacol.**, 211: 177-182, 1992.
- IGNARRO, L.J.; DEGNAN, J.N.; BARICOS, W.H.; KADOWITZ, P.J.; WOLIN, M.S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. **Biochem. Biophys. Acta.**, 718: 49-59, 1982.
- IGNARRO, L.J.; BALLOT, B.; WOOD, K.S. Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. **J. Biol. Chem.**, 259: 6201-6207, 1984.
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; BYRNES, R.; WOOD, K.S.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 246: 218-226, 1988.
- IGNARRO, L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 30: 535-560, 1990.
- IGNARRO, L.J. Signal transduction mechanism involving nitric oxide. **Biochem. Pharmacol.**, 41: 485-490, 1991.
- IGNARRO, L.J. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by porphyrins and metalloporphyrins. **Adv. Pharmacol.**, 26: 35-65, 1994.
- JIA, L.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; STAMLER, S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. **Nature**, 380: 221-226, 1996.
- JOHNSTON, B.; GABORY, J.P.; SUEMATSU, M.; KUBES, P. Nitric oxide inhibits microvascular protein leakage induced by leukocyte adhesion-independent and adhesion-dependent inflammatory mediators. **Microcirculation**, 6: 153-162, 1999.
- JONES, S.P.; GIROD, W.G.; PALAZZO, A.J.; GRANGER, D.N.; GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUIL, D.; HUANG, P.L.; LEFER, D.J. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. **Am. J. Physiol.**, 276: H1567-73, 1999.
- KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. **Lipids**, 27: 46-49, 1992.
- KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: Current concepts e controversies. **Blood**, 88: 3259-3287, 1996.

- KATAYAMA, Y. Nitric oxide: Mysterious messenger. **Dojindo Newsletter**, 1, 1995.
- KNOWLES, J.W.; REDDICK, R.L.; JENNETTE, J.C.; SHESELY, E.G.; SMITHIES, O.; MAEDA, N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. **J. Clin. Invest.**, 105: 451-458, 2000.
- KOH, S. D.; CAMPBELL, J. D.; CARL, A.; SANDERS, K. M. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. **J. Physiol.**, 489: 735-743, 1995.
- KOLB-BACHOFEN, V.; FEHSEL, K.; MICHEL, G.; RUZICKA, T. Epidermal Keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. **Lancet**, 344: 139, 1994.
- KOSHLAND, D.E. The molecular of the year (Editorial). **Science**, 258: 1861, 1992.
- KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 88: 4651-5, 1991.
- KUBES, P.; GRANGER, D.N. Nitric oxide modulates microvascular permeability. **Am. J. Physiol.**, 262: H611-5, 1992.
- KUBES, P.; KANWAR, S.; NIU, X-F.; GABOURY, J. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB Journal.**, 7: 1293-1299, 1993.
- KUBES, P.; KUROSE, I.; GRANGER, D.N. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. **Am. J. Physiol.**, 267: H931-937, 1994.
- LANE, P.; HAO, G.; GROSS, S.S. S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation. *Science's STKE.*, www.stke.org/cgi/content/full/OCsigtrans:2001/86/re1, 2001.
- LARSEN, G.L.; HENSON, P.M.: Mediators of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, 1: 335-359, 1983.
- LEFER, D.J.; NAKANISH, K.; JOHNSTON, W.E.; VINTEN-JOHANSEN, J. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after ischemia and reperfusion of dogs. **Circulation**, 88: 2337-2350, 1993.
- LENG, W.; KUO, C.G.; QURESHI, R.; JAKSCHIK, B.A. Role of leukotrienes in vascular changes in the rat mesentery and skin in anaphylaxis. **J. Immunol.**, 140: 2361-2368, 1988.

- LENTSCH, A.B.; WARD, P.A. Activation and regulation of NF κ B during acute inflammation. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 37: 205-208, 1999.
- LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, 8: 601-606, 1962.
- LILES, W.C.; VAN VOORHIS, W.C. Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. **J. Infect. Dis.**, 172: 1573-1580, 1995.
- LIPTON, A.J.; JOHNSON, M.A.; MACDONALD, T.; LIEBERMAN, M.W.; GOZAL, D.; GASTON, B. S-nitrosothiols signal the ventilatory respons. **Nature**, 413: 171-174, 2001
- LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P.; WALDMAN, S.A. Guanylyl Cyclases and Sinaling by Cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, 52: 375-413, 2000.
- LYONS, CR. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv. Immunol.**, 60: 323-371, 1995.
- MACMAHON, B.; MITCHELL, S.; BRADY, H.R.; GODSON, C. Lipoxins: revelations on resolution. **Trends Pharmacol. Sci.** 22: 391-395, 2001.
- MAJNO, G.; PALADE, G.E. Studies of inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopy study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, 11: 571-605, 1961.
- MAJNO, G.; SHEA, S.M.; LEVENTHAL, M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. **J. Cell. Biol.**, 42: 647-672, 1969.
- MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R.; LEAF, C.D.; WISHNOK, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is na intermediate. **Biochemistry**, 27: 8706-8711, 1988.
- MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 358: 127-133, 1998.
- MAYER, B.; BRUNNER, F.; SCHMIDT, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. **Biochem. Pharmacol.**, 45: 367-374, 1993.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends Biochem. Sci.**, 22: 477-481, 1997.
- McANDREW, J.; PATEL, R.P.; JO, H.; CIRBWEKKM T.; KUBCIKB, T.; MOELLERING, D.; WHITE, C.R.; MATALON, S.; DARLEY-USMAR, V. The

interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. **Sem. Perinatol.**, 21: 351-366, 1997.

MENKE, J.G.; BORKOWSKI, J.A.; BIERILO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRICK, A.W.; SCHNECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.**, 269: 21583-21586, 1994.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast Cells. **Physiol. Rev.**, 77: 1033-1079, 1997.

MICHEL, C.C.; CURRY, F.E. Microvascular permeability. **Physiol. Rev.**, 79: 703-761, 1999.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? **J. Clin. Invest.**, 100: 2146-2152, 1997.

MIDDLETON, S.J.; SHORTHOUSE, M.; HUNTER, J.O. Increased nitric oxide synthesis in ulceratives colitis. **Lancet**, 341: 465-466, 1993.

MITCHELL, J.A.; LARKIN, S.; WILLIAMS, T.J. Cyclooxygenase-2 regulation and relevance in inflammation. **Biochem. Pharmacol.**, 50: 1535-1542, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.

MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. **J. Lab. Clin. Med.**, 120: 187-191, 1992.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. England J. Med.**, 329: 2002-2112, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, 49: 137-142, 1997.

MORRIS, S.M. JR; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, 266: E829-E839, 1994.

MUIJSERS, R.B.; FOLKERTS, G.; HENRICKS, P.A.; SADEGHI-HASHJIN, G.; NIJKAMP, F.P. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. **Life Sci.**, 60: 1833-1845, 1997.

MULLIGAN, M.S.; HEVEL, J.M.; MARLETTA, M.A.; WARD, P.A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 88: 6338-6342, 1991.

- MULSCH, A.; BUSSE, R.; LIEBAU, S.; FORSTERMANN, U. LY 83583 interferes with the release of endothelium-derived relaxing factor and inhibits soluble guanylate cyclase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 247: 283-288, 1988.
- MURAD, F.; MITTAL, C.K.; ARNOLD, W. P.; KATSUKI, S.; KIMURA, H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv. Cyclic. Nucleot. Res.**; 9: 145-158, 1978.
- MUSCARÁ, M.N.; WALLACE, J.L. Nitric oxide V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. **Am. J. Physiol.**, 276: G1313-G1316, 1999.
- MYAMOTO, A.; LAUFS, U.; PARDO, C.; LIAO, J.K. Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-protein by nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 272: 19601-19608, 1998.
- NATHAN, C.F.; HIBBS JR, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.**, 3: 65-70, 1991.
- NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does make? **J. Clin. Invest.**, 100: 2417-2423, 1997.
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. **J. Rheum.**, 24: 6-8, 1997.
- NILIUS, B.; VIANA, F.; DROOGMANS, G. Ion channels in vascular endothelium. **Ann. Rev. Physiol.**, 59: 145-170, 1997.
- OLESEN, S.P.; DREJER, J.; AXELSSON, O.; MOLDT, P.; BANG, L.; NIELSEN-KUDSK, J.E.; BUSSE, R.; MULSCH, A. Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. **Br. J. Pharmacol.**, 2123: 299-309, 1998.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.
- PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S., MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333: 664-666, 1988.
- PAUL, W.; DOUGLAS, G.J.; LAWRENCE, L.; KHAWAJA, A.M.; PEREZ, A.C.; SCHACHTER, M.; PAGE, C.P. Cutaneous permeability responses to bradykinin and histamine in the guinea-pig: possible differences in their mechanism of action. **Br. J. Pharmacol.**, 111: 159-164, 1994.
- PAUL-CLARK, M.J.; GILROY, D.W., WILLOUGHBY, D.A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **J. Immunol.**, 166: 1169-1177, 2001.

- PENG, H.B.; SPIECKER, M.; LIAO, J.K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J. Immunol.**, 161: 1970-1976, 1998.
- PETER, C.; HONGWAN, D.; KUPFER, A.; LAUTERBURG, B.H. Pharmacokinetics and disposition: Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, 56: 247-250, 2000.
- PIOMELLI, O.; VOLTERRA, A.; DALE, N.; SIEGLEBAUM, S.A.; KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; BELARDETTI, F. Lipoxygenase metabolites or arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia cells **Nature**, 328: 38-43, 1987.
- POWER, C.A.; PROUDFOOT, A.E. The chemokine system: a novel broad-spectrum therapeutic targets. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1: 417-424, 2001.
- QUYYUMI, A.A.; DAKAK, N.; ANDREWS, N.P.; HUSAIN, S.; AURORA, S.; GILLIGAN, D.M.; PANZA, J.A.; CANNON, R.O. Nitric oxide activity in the human coronary circulation: impact of risk factors for coronary atherosclerosis. **J. Clin. Invest.**, 95: 1747-1755, 1995.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet.**, 2:1057-8, 1987.
- REES, D.D. **The role of nitric oxide in the cardiovascular system.** PhD thesis, Inglaterra, National Academic Awards., 1991.
- ROBERTS, W.G.; PALADE, G.E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **J. Cell Sci.**, 108: 2369-2379, 1995.
- ROBERTS, W.M.; JACOBS, R.A.; HUDSPETH, A.J. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. **J Neurosci.**, 10: 3664-3684, 1990.
- ROBITAILLE, R.; GARCIA, M.L.; KACZOROWSKI, G.J.; CHARLTON, M.P. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. **Neuron.**, 11: 645-655, 1993.
- ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, 18:217-242, 2000.
- SALVEMINI, D.; MASINI, E.; PISTELLI, A.; MANNAIONI, P.F.; VANE, J. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 17: S258-264, 1991.
- SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90: 7240-7244, 1993.

- SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 262: 193-196, 1994.
- SCHRAMMEL, A.; BEHREND, S.; SCHMIDT, K.; KOESLING, D.; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, 50: 1-5, 1996.
- SEDWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D. A. Initiation of the inflammatory response and prevention. Bonta, I.L., Bray, M.A. & Parnham, M.J. (ed). **Handbook of Inflammation**. Elsevier. 5: 27-47, 1985.
- SERHAN, C.N. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins [ATL]: a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? **Prostaglandins**, 53: 107-137, 1997.
- SIGAL, E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. **Am. J. Physiol.**, 260: L13-L28, 1991.
- SMITH, J.A.; WEBB, C.; HOLFORD, J.; BURGESS, G.M. Signal transduction pathways for B₁ and B₂ bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. **Mol. Pharmacol.**, 47: 525-534, 1995.
- SNYDER, S.H.; BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. **Sci. Am.**, 266: 68-71, 1992.
- SODIN-SEMRL, S.; TADDEO, B.; TSENG, D.; VARGA, J.; FIORE, S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. **J. Immunol.**, 164: 2660-2666, 2000.
- STASCH, J.P.; BECKER, E.M.; ALONSO-ALIJA, C.; APELER, H.; DEMBOWSKY, K.; FEURER, A.; GERZER, R.; MINUTH, T.; PERZBORN, E.; PLEISS, U.; SCHRODER, H.; SCHROEDER, W.; STAHL, E.; STEINKE, W.; STRAUB, A.; SCHRAMM M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature**, 410: 212-215, 2001.
- STAMLER, J.S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D.; KEANEY, J.; VITA, D.; SINGEL, D.J.; VALERI, J.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as a S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 7674-7677, 1992a.
- STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, 258: 1898-1902, 1992b.
- STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, 78: 931-936, 1994.

- STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 7738-7742, 1985.
- STUEHR, D.J.; GROSS, S.S.; SAKUMA, R.; LEVI, R.; NATHAN, C.F. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. **J. Exp. Med.**, 169: 1011-1020, 1989.
- SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J. Pharmacobiodyn.**, 4:565-75, 1981.
- TAKAHASHI, M.; IKEDA, U.; MASUYAMA, J.; FUNAYAMA, H.; KANO, S.; SHIMADA, K. Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. **Cytokine**, 8: 817-821, 1996.
- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 1515-1521, 1993.
- TERLUK, M.R.; DA SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in the rat aorta. **Naunyn Schmiedebeg's Arch. Pharmacol.**, 361: 477-483, 2000.
- TETSUKA, T.; DAPHNA-IKEN, D.; SRIVASTAVA, S.K.; BAIER, L.D.; DUMAINE, J.; MORRISON, A.R. Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 12168-12172, 1994.
- TSAI, A.I.; WEI, C.; KULMACZ, R.J. Interactions between nitric oxide and prostaglandin H synthase. **Arch. Biochem. Biophys.**, 31: 367-372, 1994.
- UENO, A.; TAKANA, K.; KATORI, M.; HAYASHI, M.; ARAI, Y. Species difference in increased vascular permeability by synthetic leukotriene C₄ and D₄. **Prostaglandins**, 207: 637-656, 1981.
- UENO, A.; NARABA, H.; IKEDA, Y.; USHIKUBI, F.; MURATA, T.; NARUMIYA, S.; OH-ISHI, S. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw oedema induced in IP-receptor-deficient mice. **Life Sci.**, 66: 155-160, 2000.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 38: 97-120, 1998.
- VAUGHN, M.W.; KUO, L.; LIAO, J.C. Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. **Am. J. Physiol.**, 274: H2163-H2176, 1998.

- VINEGAR, R.; MACKLIN, A.W.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Histopathological and pharmacological study of carrageenin inflammation in the rat. **Pharmacologist**, 13: 284-290, 1971.
- WAGNER, D.A.; YOUNG, V.R.; TANNENBAUM, S.R. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}\text{NH}_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 80: 4518-4521, 1983.
- WALLACE, J.L.; REUTER, B.; CICALKA, C.; MCKNIGHT, W.; GRISHAM, M.; CIRINO, G. A diclofenac derivative without ulcerogenic properties. **Eur. J. Pharmacol.**, 257: 249-255, 1994.
- WALZOG, B.; SEIFERT, R.; ZAKRZEWICZ, A.; GAEHTGENS, P.; LEY, K. Cross-linking of CD18 in human neutrophils induces an increase of intracellular free Ca^{2+} , exocytosis of azurophilic granules, quantitative up-regulation of CD18, shedding of L-selectin, and actin polymerization. **J. Leukocyte Biol.**, 56: 625-635, 1994.
- WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News Physiol. Sci.**, 15: 107-113, 2000.
- WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, 289: 646-650, 1981.
- WILLIAMS, T.J.; PECK, M.J. Role of prostaglandins-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, 270: 530-532, 1977.
- WINK, D.A.; COOK, J.A.; KIM, S.Y.; VODOVOTZ, Y.; PACELLI, R.; KRISHNA, M.C.; RUSSO, A.; MITCHELL, J.B.; JOURD'HEUIL, D.; MILES, A.M.; GRISHAM, M.B. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. **J. Biol. Chem.**, 272: 11147-11151, 1997.
- WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. The chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radic. Biol. Med.**, 25: 434-456, 1998.
- WINTER, C.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin induced oedema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 111: 544-547, 1962.
- WINTER, C.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(*p*-chlorobenzyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 141: 369, 1963.

YATANI, A.; CODINA, J.; BROWN, A. M.; BIRNBAUMER, L. Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein GK. **Science**, 235: 207-211, 1987.

ZLONTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, 12: 121-127, 2000.