



EFEITO DO L-NAME (N^ω-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER) SOBRE A ATIVIDADE DAS ISOFORMAS CONSTITUTIVA E INDUZÍVEL DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE EM PULMÕES DE CAMUNDONGOS ALÉRGICOS



Maria Júlia Peruzzi (Bolsista)¹; Simone A. Teixeira²; Marcelo N. Muscará²; Gláucia Coelho de Mello³; Edson Antunes³ (Orientador)

1. Graduanda do curso de Farmácia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP
2. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP
3. Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP (mjperuzzi@gmail.com)

Palavras Chaves: Eosinófilo - Inflamação pulmonar alérgica - Óxido nítrico - L-Name

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença mundial de prevalência progressiva responsável por grande parte dos gastos elevados em saúde pública. Esta doença é uma condição caracterizada por resposta inflamatória crônica das vias aéreas que resulta em broncoespasmo devido à liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios espasmogênicos provenientes de macrófagos alveolares, mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos (Wenzel et al., 1999; Busse et al., 2001). O NO tem sido apontado como potencial mediador na inflamação asmática. Embora a fonte exata deste NO não seja ainda clara, há indícios de que seja advindo da iNOS produzida pelas células epiteliais das vias aéreas inferiores. Resultados preliminares do grupo mostraram que o tratamento crônico oral de camundongos com N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), promove um aumento significativo no influxo eosinofílico pulmonar em resposta a desafio alergênico, mas não é capaz de alterar a atividade da iNOS pulmonar. Contrariamente, o tratamento agudo com L-NAME reduz tanto a inflamação eosinofílica pulmonar como a atividade da iNOS pulmonar. Também foi mostrado que o L-NAME não é biodisponível como tal. Após tratamento agudo com este inibidor, o metabólito ativo, N^ω-nitro-L-arginina é detectado 30 min após a ingestão, decaindo em 24 h. Por outro lado, no tratamento crônico, a concentração plasmática do mesmo metabólito manteve-se muito baixa, próxima do limite de detecção do método (Lintomen et al., 2009). Assim, hipotizamos que o tratamento prolongado com L-NAME inibe preferencialmente a atividade da cNOS, sem modificar significativamente a atividade da iNOS pulmonar. Dito de outro modo, a remoção da cNOS (isoforma fisiológica protetora) e manutenção da iNOS (isoforma patológica) pelo L-NAME crônico exacerbaria o quadro inflamatório eosinofílico pulmonar. O objetivo deste estudo é comprovar (ou não) esta hipótese, através de ensaios *in vitro* onde o efeito inibitório do L-NAME sobre a atividade da cNOS (homogenato de pulmões de camundongos controles) e da iNOS (homogenato de pulmões de camundongos desafiados com OVA) será avaliado.

Metodologia

Cada camundongo recebeu uma injeção subcutânea dorsal de OVA no dia zero e um reforço no dia 7. Nos dias 14 e 15, os animais foram desafiados com OVA por via intranasal por 2 vezes, com intervalo de 6 h entre os desafios. O grupo controle recebeu instilação intranasal de PBS. No dia 16, os animais foram anestesiados e exsanguinados para a coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e dos pulmões. Cada pulmão foi incubado, separadamente, por 30 min em concentrações crescentes de L-NAME (1 a 100 μM) e congelados em nitrogênio líquido. Os pulmões congelados foram homogeneizados para a dosagem da atividade das isoformas de óxido nítrico sintase (NOS). O método se baseia na conversão da [³H] L-arginina para [³H]-L-citrulina. A atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão das médias (E.P.M.). Diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células inflamatórias no LBA de camundongos desafiados com ovalbumina (OVA)

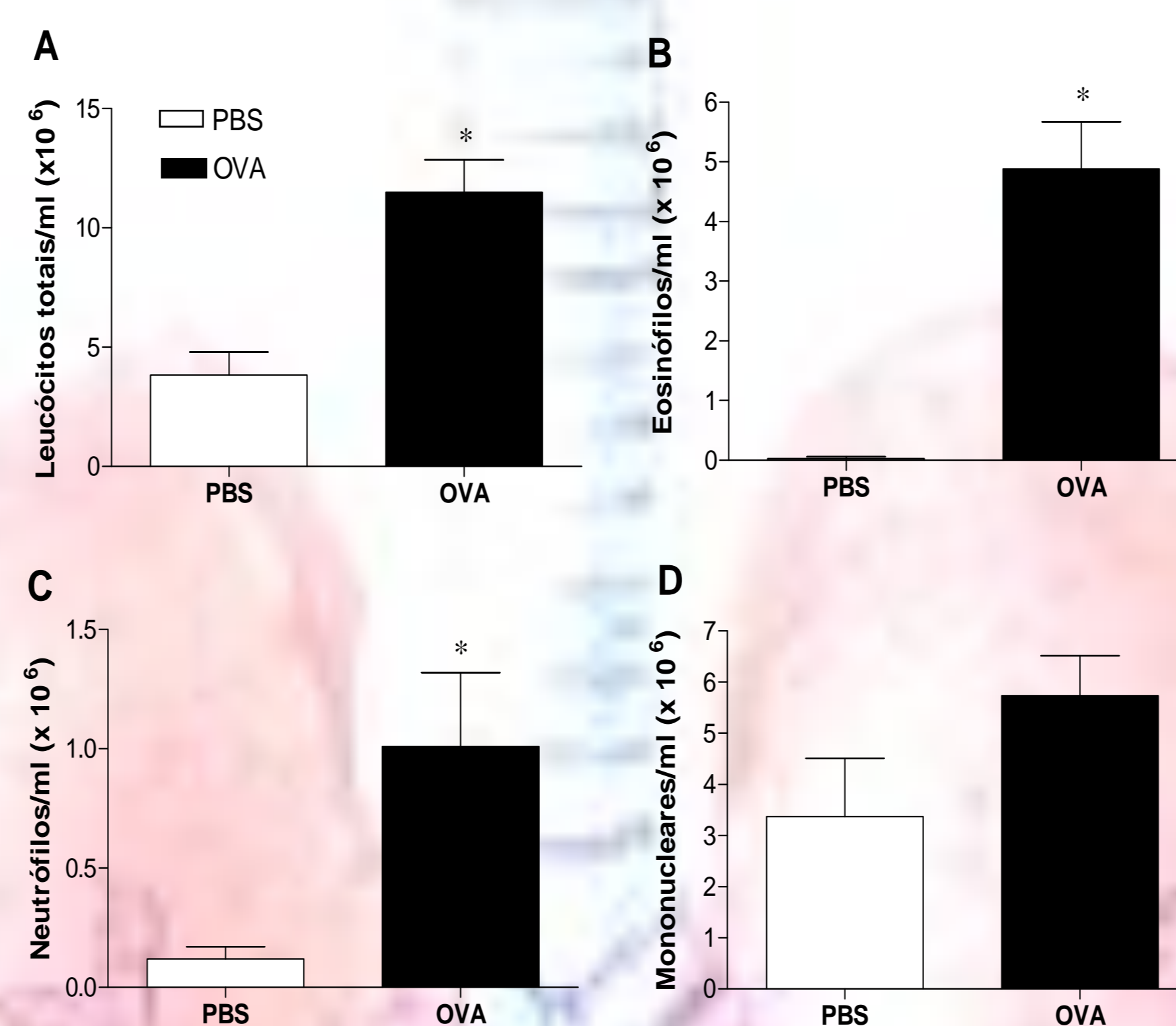


Figura 1 - Contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) de animais sensibilizados e desafiados com OVA. O LBA foi obtido 48 h após o 1º desafio com OVA. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. de n = 6-12 animais por grupo. *P<0,05 comparado ao grupo PBS.

Os resultados mostraram que o desafio de camundongos com OVA aumenta o número de eosinófilos no LBA, validando os protocolos de imunização e desafio com OVA (Fig. 1). O grupo OVA mostrou um aumento significativo ($p < 0,001$) do influxo neutrofílico (Fig.1C; $1,01 \pm 0,31 \times 10^6$ células/ml) e eosinofílico (Fig. 1B; $4,9 \pm 0,8 \times 10^6$ células/ml) quando comparado ao o grupo controle PBS ($0,12 \pm 0,05$ e $0,03 \pm 0,03 \times 10^6$ células/ml, respectivamente).

Os pulmões foram homogeneizados para medida das atividades da cNOS e iNOS. A Figura 2 mostra a porcentagem de inibição da atividade enzimática. Quando os pulmões foram incubados com L-NAME, na concentração de 100 μM, a atividade enzimática residual de iNOS e cNOS foram 40% e 15,69%, respectivamente.

Efeito de L-NAME na atividade enzimática das isoformas cNOS e iNOS no homogenato de pulmões de camundongos alérgicos.

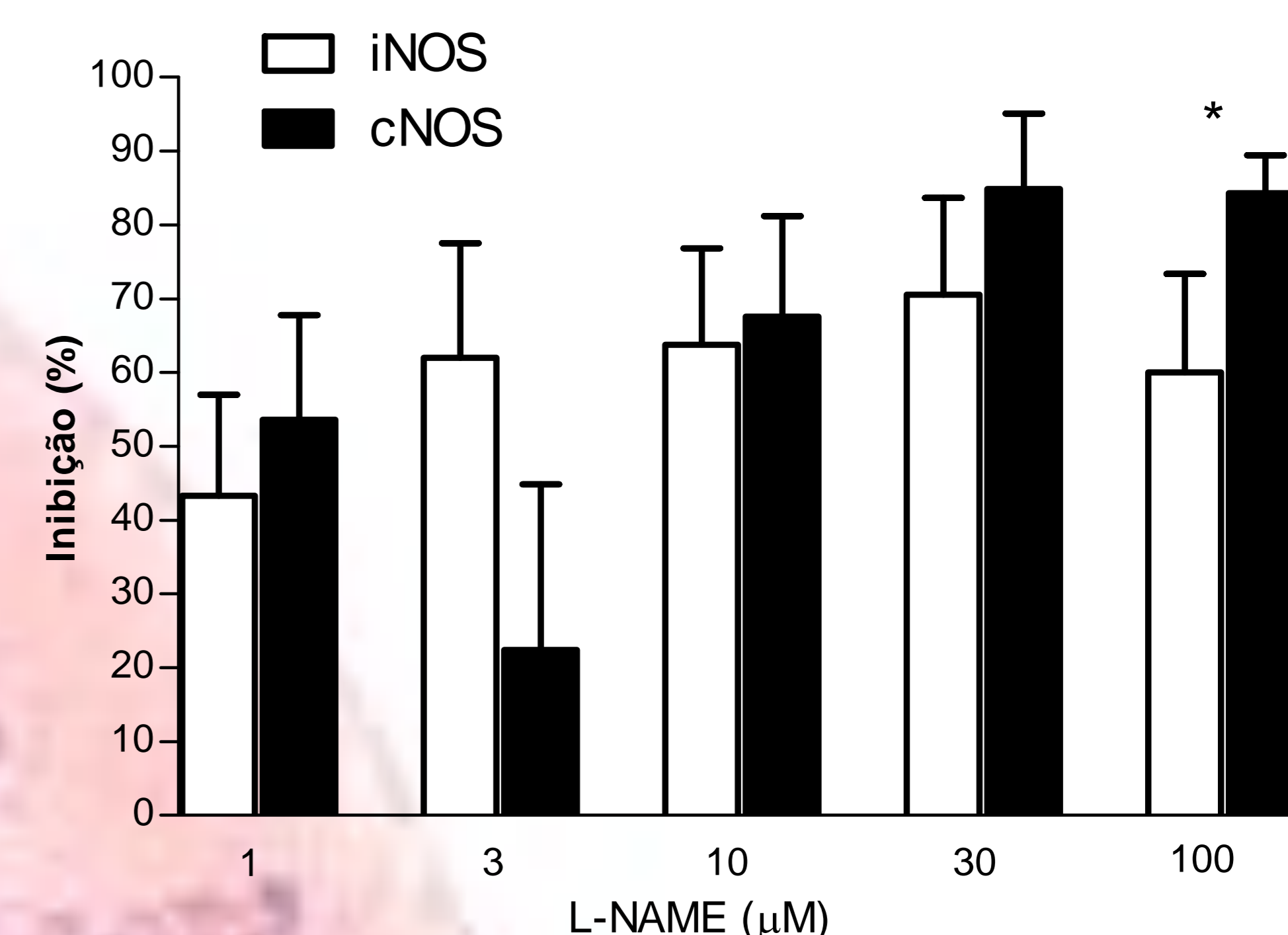


Figura 2 - Efeito do L-NAME (1-100 μM) sobre a atividade da iNOS e cNOS no homogenato pulmonar. Os dados representam a porcentagem de inibição da iNOS e cNOS no homogenato pulmonar de camundongos alérgicos. Cada coluna representa a média ± EPM de n = 6-12. *P<0,05 quando comparado com a atividade das isoformas

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a inibição de cNOS pelo L-NAME (100 μM) foi significativamente maior (84 %; $p < 0,05$) do que a de iNOS (60%). Analisando os efeitos das concentrações iniciais de L-NAME, notamos que há uma tendência da atividade da iNOS ser mais resistente à inibição *in vitro* pelo L-NAME, sugerindo que a iNOS pulmonar, provavelmente, seja mais resistente ao bloqueio pelo L-NAME *in vivo* do que a cNOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Busse WW, Lemanske Jr RF. *Asthma. The New England Journal of Medicine*, 2001; 344: 350-362.
- Lintomen L., Souza-Filho LG, Ferreira, T, Camargo EA, Teixeira SA, Muscara MN, Landgraf RG, Jancar S, Mendes GD, De Nucci G, Antunes E. Different mechanisms underlie the effects of acute and long-term inhibition of nitric oxide synthases in antigen-induced pulmonary eosinophil recruitment in BALB/C mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2009; 22: 1-8
- Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1999; 160: 1001-1008.

APOIO FINANCEIRO

