



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Adriana Corrêa Melo

**Função pulmonar, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na
lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo: diferentes
efeitos da atorvastatina, pravastatina e sinvastatina**

Rio de Janeiro

2012

Adriana Corrêa Melo

Função pulmonar, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo: diferentes efeitos da atorvastatina, pravastatina e simvastatina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto

Coorientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M528 Melo, Adriana Corrêa.

Função pulmonar, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo: diferentes efeitos da atorvastatina, pravastatina e sinvastatina / Adriana Corrêa Melo. – 2012. 120 f.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrinho Pôrto.

Coorientador: Samuel dos Santos Valença.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Lesão pulmonar aguda – Teses. 2. Estatinas (Agentes cardiovasculares) – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Inflamação - Teses. I. Pôrto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrinho. II. Valença, Samuel dos Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.24

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Adriana Corrêa Melo

Função pulmonar, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo: diferentes efeitos da atorvastatina, pravastatina e simvastatina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Apresentada em 15 de agosto de 2012.

Coorientador:

Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Gilson Melo e Alice Melo; pelo esforço, dedicação, compreensão e por acreditarem em mim, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível; não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes.

Aos meus pais Gilson e Alice; pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao meu filho Caio pelo entendimento nos momentos de estudo em que me fiz ausente.

Aos meus professores orientadores, Samuel Santos Valença e Luis Cristóvão Porto que me possibilitaram realizar um dos meus sonhos, o mestrado e agora o doutorado.

A equipe do Laboratório Compartilhado (UFRJ) e Laboratório de Reparo Tecidual (UERJ), desde os alunos de iniciação científica aos de pós-doutorado. Sem eles, nada disso seria possível.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

MELO, Adriana Correa. *Função pulmonar, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo: diferentes efeitos da atorvastatina, pravastatina e sinvastatina*. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Nosso objetivo foi determinar que tipo de estatina pode atenuar a lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos da linhagem C57Bl/6. Trinta camundongos machos (\pm 23 g) foram divididos em 5 grupos (n=6 cada): grupo LPS (10 mg/kg) administrado intraperitonealmente (i.p.), LPS mais atorvastatina (10 mg/kg/dia; grupo LPS+A), LPS mais pravastatina (5 mg/kg/dia; grupo LPS+P) e LPS mais sinvastatina (20 mg/kg/dia; grupo LPS+S). O grupo controle recebeu salina i.p.. Em um grupo separado de camundongos (n=5), a soma das pressões pulmonares resistivas e viscoelásticas (DeltaPtot) e elastância estática (E[st]) foram medidas. Um dia após a administração de LPS os camundongos foram sacrificados (24 h) por deslocamento cervical e logo em seguida foi realizado lavado broncoalveolar (LBA). Os pulmões foram removidos para análise histopatológica e homogeneizados para análises bioquímicas (ELISA, catalase, superóxido dismutase, mieloperoxidase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, carbonilação de proteínas e método de Griess). A quantidade de leucócitos foi menor no grupo LPS+P ($p < 0,01$) e LPS+S ($p < 0,05$) em comparação ao grupo LPS. Os níveis de MCP-1 e IL-6 reduziram no grupo LPS+P ($p < 0,01$), enquanto o grupo LPS + S mostrou redução apenas nos níveis de IL-6 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo LPS. Marcadores redox (superóxido dismutase e catalase) foram menores no grupo LPS+A ($p < 0,01$) em comparação ao grupo LPS. A peroxidação lipídica (malondialdeído e hidroperóxidos) diminuiu em todos os grupos tratados ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo LPS. A mieloperoxidase foi menor no grupo LPS+P ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo LPS. DeltaPtot e E(st) foram, significativamente, maiores no grupo LPS do que nos outros grupos. Nossos resultados sugerem que atorvastatina e pravastatina, mas não a sinvastatina, exibiram ações anti-inflamatórias e antioxidantes na LPA induzida por LPS.

Palavras-chave: Lesão pulmonar aguda. Lipopolissacarídeo. Estatinas. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

To determinate what statins could attenuate acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) in C57BL/6 mice. Young male mice (\pm 23 g) were divided into 5 groups (n=6 each): injected with LPS i.p. (10 mg/kg), LPS plus atorvastatin (10 mg/kg/day; LPS+A group) or pravastatin (5 mg/kg/day; LPS+P group) or simvastatin (20 mg/kg/day; LPS+S group). Control group received saline (i.p.). In a separated group of mice (n=5) the sum of pulmonary resistive and viscoelastic pressures (DeltaPtot) and static elastance (E[st]) were measured. One day later (24 h), the animals were sacrificed, BAL performed and lungs were removed for histopathological analysis and homogenized for biochemical analyses (ELISA, catalase, superoxide dismutase, myeloperoxidase, thiobarbituric acid reactive substances, protein carbonyls and griess assay). The amount of leukocytes was lower in LPS+P ($p < 0.01$) and LPS+S ($p < 0.05$). Cytokine levels of MCP-1 was lower in LPS+P ($p < 0.01$) while IL-6 was lower in LPS+P ($p < 0.01$) and LPS+S ($p < 0.05$). Redox markers (superoxide dismutase and catalase) were lower in LPS+A ($p < 0.01$). Lipid peroxidation (malondialdehyde and hydroperoxides) were lower in all treated groups ($p < 0.05$). Myeloperoxidase was lower in LPS+P ($p < 0.01$). DeltaPtot and E(st) were significantly higher in the LPS group than in the other groups. Our results suggest that atorvastatin and pravastatin, but no simvastatin, exhibits anti-inflammatory and antioxidant actions in LPS-induced ALI.

Keywords: Acute lung injury. Lipopolysaccharide. Statins. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fase aguda da lesão pulmonar – alvéolo e capilar pulmonar.....	17
Figura 2 - Fase de reparação da lesão pulmonar aguda – estrutura alveolar	18
Figura 3 - Estrutura do lipopolissacarídeo	21
Figura 4 - Processo de dismutação do oxigênio	22
Figura 5 - Sepsis levando ao estresse oxidativo	25
Figura 6 - Mecanismo de ação das estatinas	29
Figura 7 - Desenho experimental	34
Figura 8 - Lavado broncoalveolar	39
Figura 9 - qPCR para MCP-1 e IL-6	40
Figura 10 - ELISA para MCP-1 e IL-6	41
Figura 11 - Mieloperoxidase e nitrito	42
Figura 12 - qPCR para superóxido dismutase e catalase	43
Figura 13 - Atividade enzimática da superóxido dismutase e catalase	44
Figura 14 - Carbonil e hidroperóxidos	45
Figura 15 - Malondialdeído e lactato desidrogenase	46
Figura 16 - Função pulmonar	47
Figura 17 - Hematoxilina & Eosina	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•O ₂ ⁻	ânion superóxido
•OH	radical hidroxila
•ON	óxido nítrico
CAT	catalase
DNA	ácido desoxirribonucléico
EROs	espécies reativas de oxigênio
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPA	lesão pulmonar aguda
LPS	lipopolissacarídeo
NADPH	adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfatase
NFκB	fator nuclear kappa B
ONOO ⁻	peroxinitrito
PCR	proteína C reativa
RLs	radicais livres
ROOH	hidroperóxidos
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
SIRS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	EPIDEMIOLOGIA.....	14
2	LESÃO PULMONAR AGUDA.....	15
2.1	Fase aguda.....	16
2.2	Fase reparadora.....	18
2.3	Células inflamatórias específicas, vias e mediadores inflamatórios.....	19
2.4	Síndrome da resposta inflamatória aguda como causa de lesão pulmonar aguda.....	19
2.5	Lipopolissacarídeo (LPS).....	20
2.6	Radical livre.....	21
2.7	Envolvimento das espécies reativas de oxigênio na LPA.....	24
3	ESTATINAS (Inibidores da enzima HMG-Co redutase).....	28
3.1	Mecanismo de ação.....	28
3.2	Efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	30
3.3	Tipos de estatinas.....	31
3.4	Hepatotoxicidade.....	32
4	OBJETIVO.....	33
4.1	Objetivos geral.....	32
4.2	Objetivos específicos.....	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1	Animais.....	34
5.2	Desenho experimental.....	34
5.3	Lavado broncoalveolar (BAL).....	35
5.4	qPCR.....	35
5.5	ELISA.....	35
5.6	Catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).....	36
5.7	Ensaio de mieloperoxidase.....	36
5.8	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e carbonil.....	36
5.9	Nitrito.....	36
5.10	Função pulmonar.....	37
5.11	Histologia.....	37

5.12	Estatística.....	38
6	RESULTADOS.....	39
6.1	Efeitos das estatinas sobre o influxo de leucócitos.....	39
6.2	Efeitos das estatinas sobre a expressão e quantidade de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias.....	40
6.3	Efeitos das estatinas sobre a atividade de mieloperoxidase e quantidade de nitrito.....	42
6.4	Efeitos das estatinas sobre a expressão e atividade da superóxido dismutase e catalase.....	43
6.5	Efeitos das estatinas sobre os marcadores de dano oxidativo.....	45
6.6	Efeitos das estatinas sobre a função pulmonar.....	47
6.7	Efeitos das estatinas sobre o perfil histopatológico do pulmão.....	48
7	DISCUSSÃO.....	50
8	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE - Resumo dos artigos aceitos.....	64

INTRODUÇÃO

Desde a primeira descrição da Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) cientistas buscam esclarecer os mecanismos que participam da patogênese da lesão pulmonar aguda (LPA) com o objetivo de desenvolver estratégias terapêuticas e novas drogas para estes pacientes. O lipopolissacarídeo (LPS) é um importante indutor de lesão pulmonar e endotoxemia e por isso, é utilizado para provocar LPA em modelos animais. Observa-se em modelos de LPA, a presença de extravasamento vascular, com movimento de fluidos e macromoléculas para o interior do interstício e espaço aéreo. A disfunção da barreira vascular pulmonar, a diapedese transendotelial de células inflamatórias para dentro do tecido pulmonar, contribuem para disfunção vascular e alveolar. Além dessas alterações, observa-se também um aumento na produção de radicais livres de oxigênio levando a um desequilíbrio na produção de oxidantes com relação a produção de antioxidantes e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo e dano tecidual.

A suplementação com antioxidantes pode inibir a propagação das espécies reativas de oxigênio, evitando que se chegue ao estresse oxidativo e a fase de dano celular. É mais do que sabido que as estatinas reduzem o colesterol e protegem o organismo da doença aterosclerótica. Recentes pesquisas têm identificado propriedades pleiotrópicas das estatinas, isto é, propriedades que vão além das já conhecidas propriedades hipolipemiantes, tais como anti-inflamatórias e antioxidantes. O presente estudo foi desenhado para explicar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de três tipos de estatinas e se estes efeitos produzem melhora na função pulmonar em camundongos com LPA induzida por LPS.

1 EPIDEMIOLOGIA

A incidência da LPA é de 17-34 por 100.000 pessoas por ano nos EUA (1-3). Infelizmente, apesar dos estudos populacionais demonstrarem bastante consistência em relação à idade (média de 60 anos), mortalidade (35-40%) e proporção de incidência de SDRA e LPA (em torno de 70%), esses dados são menos consistentes internacionalmente (4, 5). Um recente estudo americano de coorte prospectivo populacional demonstrou elevada incidência, em torno de 78,9 por 100.000 pessoas por ano e, a partir daí, deduziu-se que 190.600 casos podem ocorrer somente nos EUA a cada ano (4). A mortalidade intra-hospitalar foi de 38,5% para LPA e 41,1% para SDRA. Mais de 75% dos casos de LPA estão associados a infecções quer nos pulmões quer em outras partes do corpo, e ao uso da ventilação mecânica (6).

A maioria das mortes é atribuída a sepse ou síndrome de disfunção múltipla dos órgãos (7). Em comparação com as taxas de mortalidade de 55 a 65% relatadas em pesquisas nos anos 80 e início dos anos 90, a mortalidade global parece ter diminuído ligeiramente nos últimos 20 anos, talvez relacionada a alterações no método de ventilação mecânica e melhoria no suporte a pacientes graves (8).

2 LESÃO PULMONAR AGUDA

A LPA e sua forma mais severa de manifestação, a SDRA, é uma síndrome clínica definida por hipoxemia respiratória aguda, infiltrado pulmonar bilateral consistente com edema e pressão de enchimento cardíaco normal (9).

Para a normalidade da função pulmonar há necessidade de alvéolos intimamente associados a capilares adequadamente perfundidos. O capilar pulmonar normal apresenta endotélio seletivamente permeável, onde as proteínas permanecem no meio intravascular, enquanto os líquidos atravessam as membranas como resultado do balanço entre as forças hidrostáticas e gradientes osmóticos. O equilíbrio entre essas forças permite, habitualmente, que pequenas quantidades de proteínas extravasem para o espaço intersticial pulmonar. Porém, existem três mecanismos que impedem a formação do edema intersticial, são eles: proteínas intravasculares que mantêm gradiente osmótico favorável à reabsorção de líquido; os vasos linfáticos intersticiais que podem drenar grande quantidade de líquido para a circulação; junções intercelulares firmes entre as células epiteliais alveolares que previnem o enchimento dos espaços aéreos (10).

Existem 2 formas de LPA: a) primária, causada por uma injúria pulmonar direta (Por ex.: pneumonia) e b) secundária, causada por um insulto indireto (Por ex.: pancreatite) (11). Os pulmões são, particularmente, vulneráveis a lesões inflamatórias, visto que os mediadores que são liberados na circulação vão para os pulmões pois os mesmos recebem a totalidade do débito cardíaco. As causas mais comuns de LPA/SDRA são: sepse (a de maior incidência é a sepse de origem pulmonar) ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS); lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica, trauma, aspiração, transfusão sanguínea múltipla, pancreatite aguda, lesão inalatória e certos tipos de toxicidade a drogas (12-17).

Enquanto a lesão sistêmica ou lesão direta no pulmão pode incitar nos pacientes suscetíveis uma lesão pulmonar, tal resposta inflamatória pode ser pior quando associada a outros insultos no pulmão como a ventilação mecânica com elevados volumes correntes e/ou hiperóxia (18).

A LPA/SDRA se caracteriza por 2 fases – uma fase aguda, onde se observa uma ruptura da membrana alvéolo-capilar, extravasamento de líquido rico em proteínas para o interior do interstício e espaço alveolar, extensiva liberação de citocinas e migração de neutrófilos e uma fase reparadora, mais tardia, a qual é caracterizada por uma proliferação de fibrina e organização do tecido pulmonar (9).

2.1 Fase aguda

A patologia central é a ruptura da interface alvéolo-capilar, que se refere a duas barreiras distintas, a membrana basal do endotélio e células que revestem a superfície alveolar, pneumócitos do tipo I. Esta fase se caracteriza pelo preenchimento alveolar com um líquido rico em proteína, secundário a perda da integridade da membrana alvéolo-capilar, com um padrão heterogêneo de envolvimento alveolar (figura 1) (11, 15, 18). Existem dois tipos de células epiteliais alveolares, pneumócitos tipo I e II e ambas estão prejudicadas na LPA. Neutrófilos e macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias, oxidantes, proteases, leucotrienos e fator de ativação plaquetária nesta fase. O dano dos pneumócitos do tipo I causam ruptura da integridade da barreira alvéolo-capilar permitindo o acúmulo de líquidos no interstício pulmonar, proteínas, neutrófilos, hemácias e fibroblastos que extravasam para o interior do alvéolo.

O dano do endotélio vascular e do epitélio alveolar resulta na criação de uma interface entre o pulmão e o sangue facilitando a propagação de microorganismos a partir do pulmão, alimentando assim a resposta inflamatória sistêmica.

A lesão dos pneumócitos do tipo I prejudicam a habilidade do pulmão em bombear o líquido para fora do espaço aéreo (16). O dano dos pneumócitos do tipo II reduz a produção de surfactante, o que leva a atelectasia. Os pneumócitos do tipo II apresentam uma diminuição na capacidade de se diferenciar, através da membrana basal, em pneumócitos do tipo I, e, assim como este último, uma inabilidade para transportar íons e, portanto, remover líquido dos alvéolos (19, 20).

Anormalidade na coagulação ocorre incluindo fibrinólise anormal e formação de fibrinas o qual resulta em oclusão microvascular, causando *shunt* intrapulmonar levando a hipoxemia. O déficit na ventilação/perfusão, secundária a entrada de líquido na luz do alvéolo e ao colapso alveolar, aumenta o espaço morto levando a hipercapnia e acidose respiratória. Nesse contexto, na fase aguda, o paciente apresenta baixo volume corrente, atelectasia, redução da complacência e alteração da ventilação/perfusão (aumento do espaço morto) (21). As características clínicas são: dispneia intensa, taquipneia e hipoxemia resistente. A liberação de mediadores inflamatórios de dano do tecido pulmonar desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica a qual pode progredir para falência múltipla de órgãos levando à morte dos pacientes com LPA/SDRA (2, 3, 5, 18).

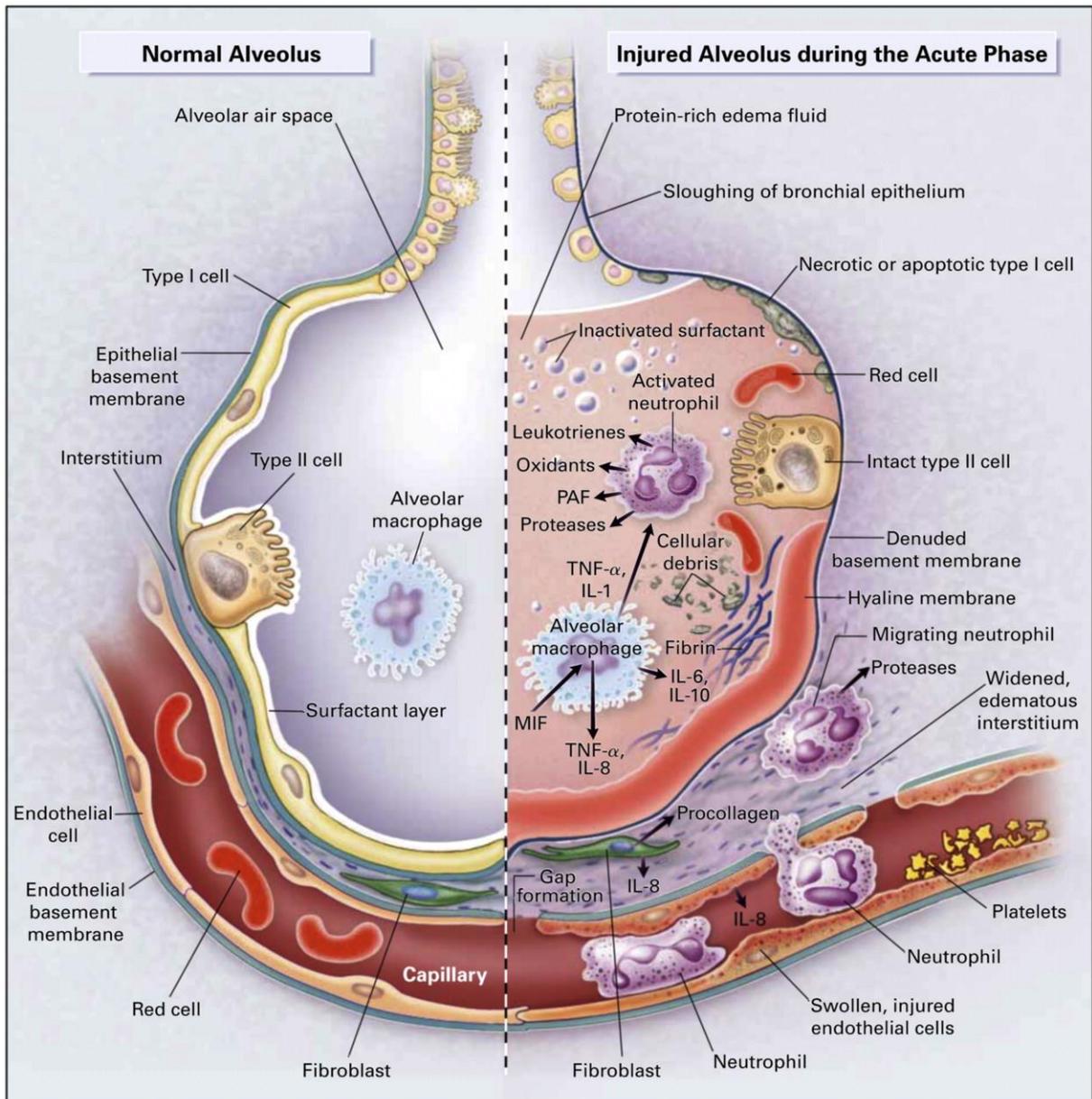


Figura 1 – Fase aguda da lesão pulmonar – alvéolo e capilar pulmonar.

Fonte: <http://ajrcmb.atsjournals.org/content/33/4/319/F4.large.jpg>

2.2 Fase reparadora

Esta fase é dependente do reparo do epitélio alveolar e da remoção do edema e das proteínas do espaço alveolar. Os pneumócitos do tipo II proliferam ao redor da membrana basal do alveolo e então diferenciam-se em células alveolares do tipo I. O líquido é removido pelo movimento inicial dos íons sódio para fora do alvéolo via transporte ativo nos pneumócitos do tipo II. A água se move através de canais de água, as aquaporinas, localizados primariamente nos pneumócitos do tipo I, mas também por uma via paracelular. A proteína solúvel é removida, principalmente, por difusão paracelular e, secundariamente, por endocitose. Macrófagos removem as proteínas insolúveis e neutrófilos apoptóticos por fagocitose (18, 20, 21).

Observa-se nessa fase um remodelamento gradual e resolução através de tecido de granulação e fibrose (figura 2).

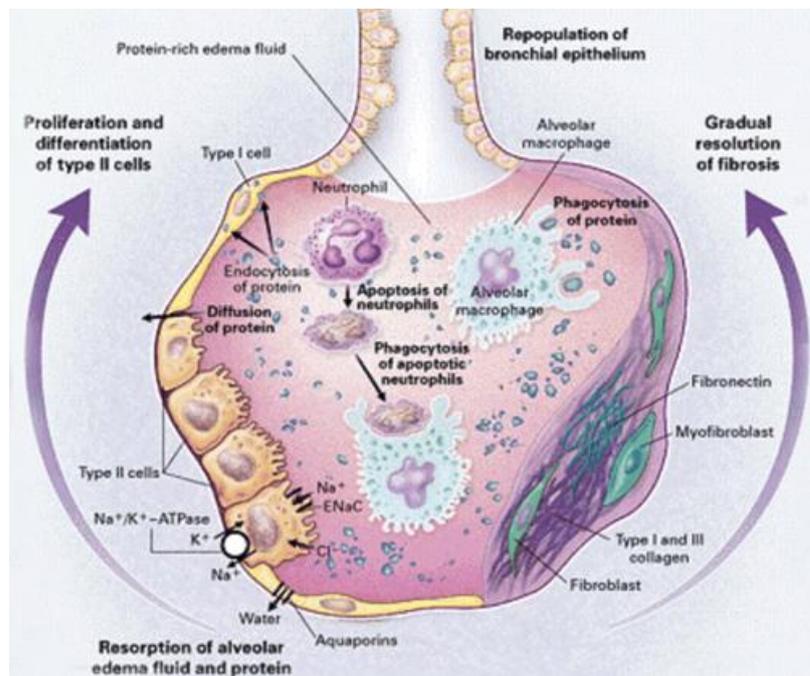


Figura 2 – Fase de reparação da lesão pulmonar aguda – estrutura alveolar.

Fonte: http://www.cesil.com/leaderforchemist/articoli/2005/numero6_05/rossi_ing/articolo1.htm

2.3 Células inflamatórias específicas, vias e mediadores inflamatórios

O acúmulo de neutrófilos ativados no pulmão é um passo inicial no processo inflamatório pulmonar que leva a LPA e é um marcador histológico importante (20, 22). Os neutrófilos estimulam a lesão pulmonar por diversos mecanismos: pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), produção de citocinas e fatores de crescimento que amplificam a resposta inflamatória e estimulam a liberação de enzimas proteolíticas. Enzimas proteolíticas são potencialmente lesivas ao pulmão, predominando a elastase de neutrófilos (23, 24). Os níveis plasmáticos de elastase de neutrófilos estão aumentados em pacientes com risco para SDRA após o trauma e naqueles com SDRA estabelecida após trauma (25, 26). Outras proteases que estão elevadas no LBA de pacientes com LPA incluem as colagenases e as gelatinases A e B (27).

O fator nuclear κ B (NF κ B) é um fator de transcrição com papel pró-inflamatório implicado no desenvolvimento da LPA (28). Em resposta a um estímulo inflamatório I κ B é fosforilado por I κ B quinase, I κ B se solta do complexo NF κ B e é degradado pelo proteossoma 26S e, desta forma, NF κ B se transloca para o núcleo da célula para ativar a transcrição gênica e dar início a uma cascata de eventos inflamatórios como a produção de citocinas (como interleucina-6/IL-6, interleucina-8/IL-8 e fator de necrose tumoral α /TNF- α) além do recrutamento de outras células inflamatórias (29).

2.4 Síndrome da resposta inflamatória sistêmica como causa de lesão pulmonar aguda

A SIRS representa um desequilíbrio da resposta imunológica levando a liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e aminas vasoativas. Os mediadores inflamatórios na circulação causam dano ao endotélio e comprometem o sistema vascular, desencadeando a cascata da coagulação e culminando, potencialmente, na coagulação intravascular disseminada. A lesão tecidual induzida pela SIRS é o resultado de uma combinação de uma resposta inflamatória exagerada, lesão vascular e comprometimento da microcirculação secundária a formação de microtrombos (12, 18, 25). Embora a resposta inflamatória seja sistêmica, o dano pode se manifestar primeiro ou em maior grau em um determinado órgão individualmente. Os pulmões são particularmente sensíveis a sepse ou SIRS. Sepse é definida em humanos como uma resposta inflamatória sistêmica a uma

infecção conhecida, portanto, quando uma infecção bacteriana é diagnosticada (ou uma hemocultura positiva é obtida), SIRS torna-se sepse (18, 30).

Acredita-se que doenças resultantes de lesão endotelial difusa, causadas por persistente estímulo inflamatório, são responsáveis pelo comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas.

Na sepse por bactérias gram-negativas, ou gram-positivas, ou vírus, ou fungos e em doenças não infecciosas como a pancreatite, o trauma, reação à droga, doenças autoimunes, choque hemorrágico, queimaduras extensas, entre outras, ocorre um estímulo inflamatório (31-33). Atualmente, o LPS é considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias gram-negativas bem como por inflamação sistêmica (34).

2.5 Lipopolissacarídeo (LPS)

O LPS que é um tipo de endotoxina (figura 3) é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa. Sua estrutura é composta por duas camadas de açúcar e uma camada lipídica, uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente. A porção lipídica é considerada a responsável pela ação antigênica do LPS (35-37).

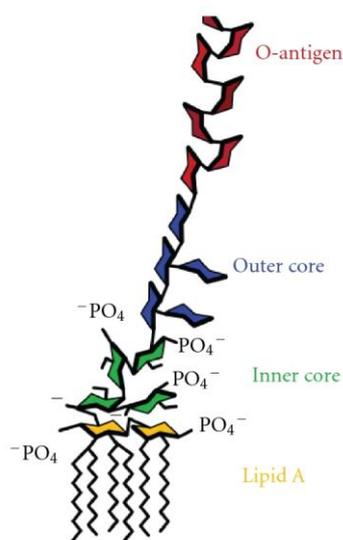


Figura 3 – Estrutura do lipopolissacarídeo.

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide>

Essa endotoxina desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios. Os principais estão localizados na membrana celular, denominados receptores *toll-likes* (35, 37). O LPS é conhecido como potente ativador de genes relacionados à resposta inflamatória aguda. Esta característica confere, portanto, a possibilidade de amplificação e perpetuação de um sinal inicialmente gerado pelo LPS (28, 36).

2.6 Radical Livre

Os radicais livres são espécies reativas caracterizadas por possuírem um número ímpar de elétrons em sua última camada (e^-) (38). Um grande número de pesquisas sugerem que aumento na produção de radicais combinado a diminuição da capacidade antioxidante pulmonar pode contribuir para o prognóstico de pacientes com LPA (39-44). Os radicais livres contribuem para o dano vascular visto na sepse ou após a isquemia/reperfusão inerente ao processo da SDRA (39). Os radicais livres estão também envolvidos na regulação do tônus vasomotor por atuar no endotélio e nas células musculares lisas (45-48).

Os radicais tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxil (OH^{\bullet}) contêm elétrons desemparelhado enquanto peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidropéroxidos ($ROOH$) não têm essa condição (38). Os radicais livres podem reagir com outros radicais livres combinando seus elétrons ou, se suficientemente reativos, com moléculas não radicalares.

Quando estas últimas são ácidos graxos poli-insaturados o ataque de radicais livres pode dar início a uma reação em cadeia. A maioria dos radicais livres em sistemas biológicos reagem rapidamente com abundantes moléculas de oxigênio (figura 4).

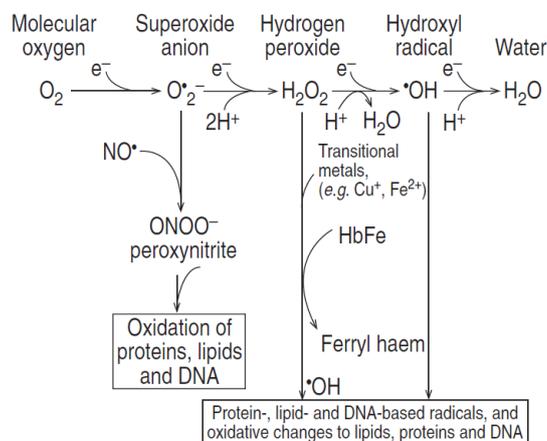


Figura 4 – Processo de dismutação do oxigênio.

Fonte: <http://www.jornallivre.com.br/150413/o-que-e-dismutacao.html>

A redução univalente de oxigênio (O_2), isto é, a adição de um elétron de O_2 produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ um subproduto do metabolismo aeróbico normal. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é um bom agente redutor mas uma pobre molécula oxidante, cujo destino e reação dependem grandemente das condições ambientais na qual ele é gerado (44). Este radical é rapidamente inativado pela superóxido dismutase (SOD) ou por reações com o óxido nítrico. A interação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com NO^\bullet é mais rápida do que com a SOD, limitando qualquer efeito vasodilatador mediado pelo NO^\bullet . Tais reações produzem peroxinitrito (ONOO^-), referido como uma ERN (45-48).

Duas moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ são reduzidas, quer espontaneamente ou catalisada pela SOD para formar O_2 e H_2O_2 . O H_2O_2 é uma molécula que, ao contrário do $\text{O}_2^{\bullet-}$, pode entrar em muitas células da mesma forma que a água (40). É uma molécula relativamente estável, a menos que íons de metais de transição (tais como ferro e cobre) estejam presentes. Assim, na presença de um sal de ferro, H_2O_2 é decomposto para se obter o altamente reativo radical hidroxila (OH^\bullet) pela reação de Fenton (41).

Os radicais livres são biologicamente produzidos em células por reações de transferência de elétrons e servem como moléculas sinalizadoras e mensageiras (44). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é produzido pela atividade de fagócitos como parte do sistema de defesa microbiano. Durante

o metabolismo normal $O_2^{\bullet-}$ é constantemente formado durante a oxigenação da hemoglobina, e através do escape de elétrons da cadeia transportadora (49-51). A produção acidental de radicais livres é catalisada pela cadeia transportadora de elétrons, por remoção enzimática, *scavenging* e íons metálicos sequestrados.

Tais sistemas são coordenados para prover importantes mecanismos biológicos de defesa antioxidante. Tal proteção pode ser ineficiente e o dano oxidativo por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema antioxidante poderá ocorrer (38). A produção de radicais livres nas células pode ser aumentada por uma elevação nas concentrações de O_2 no microambiente e por toxinas (49). Existem muitas fontes de geração de radicais livres as quais incluem: auto-oxidação e ciclorredox de pequenas moléculas - gerado por enzimas, fuga de elétrons da cadeia transportadora, estados de hipo ou hiperóxia e síndromes de reoxigenação (52).

Em um estado normal de saúde, a formação de oxidantes é equilibrada pela eficiente remoção dos mesmos através do sistema antioxidante (53). As defesas antioxidantes encontradas no plasma e nos tecidos podem ser classificadas em primária, secundária e terciária. A defesa primária é melhor descrita e compreende o sistema que impede a formação dos radicais. As propriedades de ligação do ferro com a transferrina e lactoferrina desempenham esse papel nos fluidos extracelulares, quando ligados corretamente, isto é, aos sítios de ligação de alta afinidade destas proteínas, e, portanto, não há formação de radicais livres. As defesas secundárias removem ou inativam a formação de radicais livres. Em alguns casos, tais defesas secundárias podem ser sistemas de enzimas tais como SOD, catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) ou moléculas de baixo peso molecular tais como a vitamina E, ascorbato e glutathione. As defesas terciárias trabalham para remover e reparar o dano oxidativo e são particularmente importantes para o ácido desoxirribonucleico (DNA) (54).

As três formas de SOD estão fisiologicamente presentes: SOD cobre e zinco no citoplasma, SOD manganês na mitocôndria e SOD extracelular, importante na matriz extracelular. Dependendo das concentrações e condições, SOD pode proteger o NO^{\bullet} através da inativação do $O_2^{\bullet-}$ (55). A presença de SOD ao longo da via de difusão do NO^{\bullet} nas células musculares lisas do vaso, pode ativá-lo biologicamente aumentando sua meia vida e favorecendo uma função para SOD extracelular como um mediador da atividade do NO^{\bullet} na manutenção de um baixo tônus vascular pulmonar (50). A distribuição da SOD extracelular sugere que seu papel específico pode incluir a proteção da superfície de células endoteliais contra o estresse oxidativo (46).

Os sistemas redox das células também mantêm concentrações elevadas de glutathione reduzida (GSH) que pode ser utilizada para detoxificar H_2O_2 e hidroperóxido de lipídeos (56). Durante períodos de estresse oxidativo, GSH é convertida em glutathione oxidada (GSSG), a qual pode ser convertida, novamente, à GSH pela GSH redutase. A via de detoxificação do H_2O_2 leva a um acúmulo de GSSG. Uma vez que altas concentrações de GSSG pode ser citotóxicas, esta enzima é rapidamente removida da célula (57).

A catalase é também uma enzima importante que reduz o H_2O_2 a H_2O , removendo um intermediário chave na formação de $NO\bullet$ e ácido hipocloroso. A concentração de catalase no pulmão é baixa, prevalecendo outros tipos de defesa antioxidante (58).

2.7 Envolvimento das espécies reativas de oxigênio na lesão pulmonar aguda

A ativação de neutrófilos sequestrados da circulação pelo processo inflamatório pulmonar causa à liberação de radicais livres que são substâncias consideradas essenciais e modulam o dano ao endotélio vascular pulmonar caracterizado na LPA (Figura 5). A disfunção e a ruptura da barreira endotelial são responsáveis pela principal manifestação clínica desta doença (27, 38, 50).

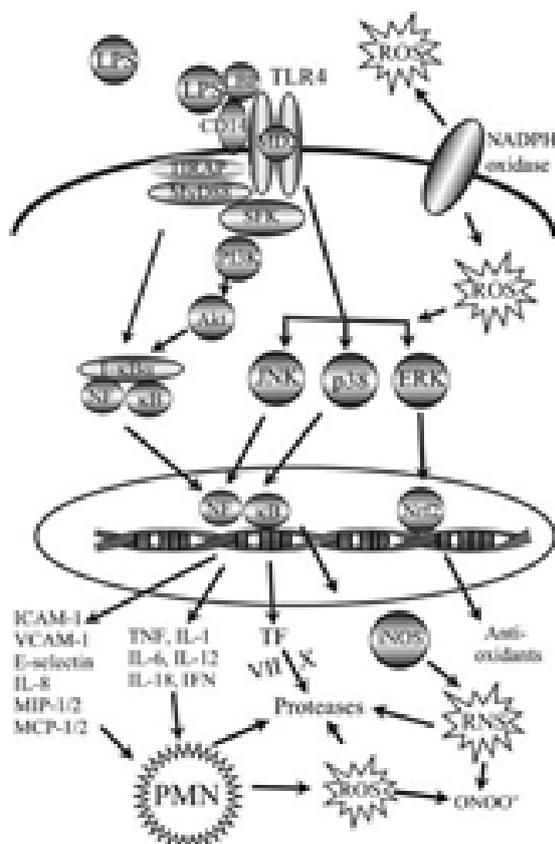


Figura 5 – Sepsis levando ao estresse oxidativo; interferência dos radicais livres na função vascular.

Fonte: <http://www.comprehensivephysiology.com/WileyCDA/CompPhysArticle/refId-c100013.html>

A contribuição dos radicais livres para a regulação fisiológica do tônus dos vasos pulmonares permanece um tópico de interesse nas pesquisas. No entanto, existem evidências consideráveis que suportam o papel deletério de radicais livres nas anormalidades vasculares pulmonares que caracterizam a SDRA. Em modelos com animais, a formação de edema e vasoconstrição são observadas quando um sistema de geração de oxidantes, tal como xantina oxidase é infundida nos pulmões de coelhos (59). O H₂O₂ parece ser mais prejudicial para as células endoteliais, gerando subsequentemente OH•. Os radicais livres podem contribuir indiretamente na geração de LPA/SDRA por inativar antiproteases e depletar antioxidantes (60, 61).

As membranas celulares são formadas por uma bicamada de fosfolípidos e proteínas intrínsecas e, conseqüentemente, suscetíveis ao dano oxidativo, resultando em uma reação radicalar em cadeia conhecida como peroxidação lipídica (62). A destruição oxidativa dos ácidos graxos de membrana são, particularmente, prejudiciais. Em primeiro lugar, por destruir

a integridade da membrana e, em segundo lugar por produzirem produtos peroxídicos e aldeídicos que são altamente citotóxicos (63). O DNA é um alvo altamente sensível ao dano oxidativo uma vez que modificações podem levar a lesões mutagênicas (54).

É cada vez mais evidente que a circulação pulmonar não é meramente uma conduta passiva envolvida na troca gasosa, mas sim um sistema complexo composto por células altamente diferenciadas com funções especializadas que desempenham papéis importantes na saúde e na doença (19, 26, 46). As células endoteliais desempenham um papel chave na regulação do tônus vascular e a disfunção endotelial é um marcador da SDRA (25, 33). Em vários modelos animais e modelos de órgãos isolados, a lesão endotelial parece ser dependente de neutrófilos (22, 26). Os neutrófilos ativados podem afetar a morfologia da célula endotelial e quando esta é alvo de endotoxinas, pode causar uma lesão em sua membrana (20). As ERO originárias no interior das células endoteliais podem também regular a lesão endotelial na ausência de neutrófilos especificamente na hiperoxia, na lesão por isquemia e reperfusão e lesão indireta nas células endoteliais por endotoxina (64-66).

O efeito direto dos radicais livres no músculo liso do vaso não é muito claro. O $O_2^{\bullet-}$ tem um efeito contrátil fraco, provavelmente devido à inativação de NO^{\bullet} . Além disso, a interação química entre NO^{\bullet} e $O_2^{\bullet-}$ leva à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é um complexo biológico reativo (50). A produção persistente de $ONOO^-$ pode causar depleção de tiols e, portanto, a proteção antioxidante eventualmente leva a lesão oxidativa e prejuízo das funções fisiológicas (45-48).

Existem relatos conflitantes da ação de EROs no músculo liso da artéria pulmonar. Altas doses de H_2O_2 causam contração reversível independente do endotélio em músculos lisos de artérias pulmonares de ratos, acompanhadas por alguns danos no músculo liso vascular (67, 68). O $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e os neutrófilos ativados induzem respostas contráteis nas artérias pulmonares (46, 68). A contração induzida por neutrófilos é mediada através da liberação de produtos da ciclo-oxigenase enquanto que, quando causada por radicais livres, é modulada pela ativação da proteína quinase C (69, 70).

A importância da ativação inicial do neutrófilo pela endotoxina foi observada em diversos modelos experimentais (71). Em coelhos, a administração de baixas doses de endotoxina não causou lesão pulmonar, mas neutrófilos pré-tratados com endotoxina e infundidos em animais, são mais retidos dentro do pulmão do que as células que não foram pré-tratadas (43, 59, 69).

A endotoxina pode aumentar a produção de oxidantes pela ativação de neutrófilos, estimulados por monócitos, ativando o sistema complemento e por fim, provocando lesão nas

células endoteliais (35, 71). A ativação do complemento pela endotoxina pode iniciar e propagar lesão pulmonar. Fragmentos do complemento podem promover a liberação de $O_2^{\bullet-}$ pelos neutrófilos, estimulação de monócitos e macrófagos e conversão da xantina desidrogenase para xantina oxidase (37).

3 ESTATINAS (INIBIDORES DA ENZIMA HMG-CoA REDUTASE)

Em 1971 o microbiologista Akira Endo, observou que certos microorganismos eram capazes de produzir um potente inibidor da produção de colesterol. Esta substância foi isolada em laboratório originando a matriz das estatinas, a partir do qual começaram a ser sintetizadas (72). As estatinas são uma classe de drogas utilizadas para baixar os níveis de colesterol por meio da inibição da enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A redutase que tem um papel fundamental na produção do colesterol no fígado (73). O aumento dos níveis de colesterol está associado a doenças cardiovasculares e as estatinas são, portanto, utilizadas na prevenção dessas doenças (74).

Alguns pesquisadores têm mostrado que o tratamento com estatinas promovem uma proteção que vai além dos efeitos de redução do colesterol. Há algumas evidências que as estatinas reduzem a proteína C reativa (PCR), um marcador chave de inflamação, o qual por ele mesmo é um fator independente para morbidade e mortalidade cardiovascular (75). Esta redução na PCR é, provavelmente, uma consequência da habilidade da estatina em reduzir a produção de interleucina-6 (IL-6), a citocina que é ativada na fase aguda da resposta PCR. Baseado nessas observações tem sido proposto que a efetividade clínica das estatinas seria uma combinação de funções incluindo a redução de colesterol, efeitos anti-inflamatórios, antitrombóticos, antioxidantes e imunomodulatórios - efeitos esses denominados de pleiotrópicos (76).

3.1 Mecanismo de ação

As estatinas apresentam uma similaridade estrutural a do substrato 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), inibindo esta enzima, a qual é indispensável na biossíntese do colesterol (77). A biossíntese de colesterol no organismo consiste num processo de 28 etapas, iniciando-se a partir da associação de 3 moléculas de acetil-coenzima A (acetil Co-A) para a formação de HMG-CoA. A segunda etapa corresponde à conversão de HMG-CoA em mevalonato e é catalisada pela enzima HMG-CoA redutase, representando a etapa limitante de controle da síntese de colesterol, sendo um importante alvo farmacológico (78). Terapeuticamente, as estatinas pertencem a uma classe de fármacos classificadas como inibidores competitivos da HMG-CoA redutase. Elas inibem uma etapa inicial e limitante da biossíntese de colesterol no fígado (72, 74, 76, 77). Esta etapa provoca a

inibição da conversão da HMG-CoA em mevalonato (figura 6). As estatinas ligam-se de maneira reversível, competitiva e mais potente do que o substrato natural da enzima HMG-CoA redutase, impedindo a biossíntese de colesterol (76). O grupo HMG das estatinas, liga-se a mesma região enzimática que o grupo HMG do substrato, bloqueando, assim, o seu acesso ao sítio catalítico, inibindo a HMG-CoA redutase.

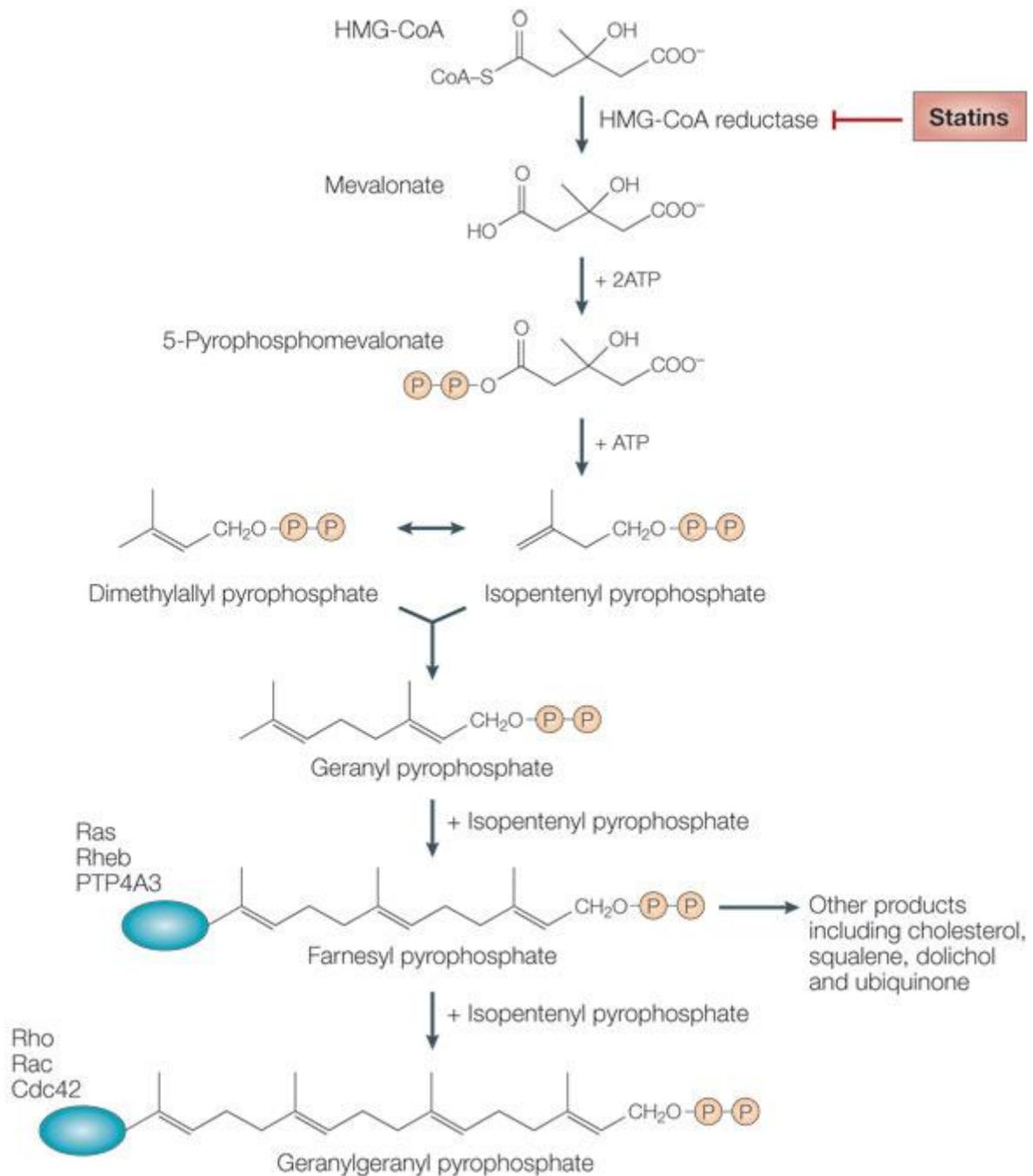


Figura 6 – Mecanismo de ação das estatinas.

Fonte: <http://www.nature.com/nrc/journal/v5/n12/images/nrc1751-f1.jpg>

3.2 Efeitos pleiotrópicos das estatinas

Os efeitos pleiotrópicos se devem, na sua maioria, a interferência causada pelas estatinas na formação de intermediários isoprenoides (Ex.: farnesil pirofosfato e geranylgeranyl pirofosfato) por inibição da biossíntese do mevalonato, os quais servem de ligantes lipídicos moduladores de processos pós-translacionais (prenilação) de moléculas proteicas que se encontram envolvidas em processos de sinalização celular (76). As estatinas possuem vários mecanismos de ação que podem ser inter-relacionados resultando na redução da inflamação (79, 80). Estes incluem: modulação do conteúdo de colesterol e assim redução na formação de bases lipídicas e subsequentes efeitos na ativação e regulação das células do sistema imunológico e, prevenção da prenilação de moléculas sinalizadoras e subsequentemente a *downregulation* da expressão gênica, ambas resultando na redução da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular (81, 82). As bases lipídicas são pequenas estruturas que fazem parte da membrana celular ou microdomínios, ricas em colesterol e glicoesfingolipídeos, o qual reside enzimas intracelulares, principalmente quinases. Estas bases lipídicas podem ser translocadas pelo citoesqueleto de actina o qual controla especificamente sua redistribuição, *clustering* e estabilização dentro da membrana celular. Quando essas bases se reúnem, elas formam sítios críticos para processos tais como, movimento celular, transporte intracelular ou transdução de sinal (83, 84). As bases lipídicas atuam como plataformas, reunindo moléculas essenciais para ativação das células do sistema imunológico, mas também separando tais moléculas quando as condições para a ativação não são apropriadas (85).

Várias evidências sugerem que a inibição da síntese do colesterol pelas estatinas rompem essas bases lipídicas que influenciam a função dos linfócitos (86-89). Além disso, por inibição na prenilação de proteínas, um processo também dependente do mevalonato, as estatinas bloqueiam a membrana alvo e a atividade das pequenas GTPases que controlam múltiplas vias desencadeadas por esses receptores. A ativação dos linfócitos T dependem fundamentalmente da Ras, Rho e Rab GTPases. A sinalização dos receptores de antígenos é orquestrada em bases lipídicas, identificando, assim, os linfócitos T como potenciais alvos celulares das estatinas (90, 91).

As alterações observadas na síntese de citocinas com a terapia com estatinas, pode ser uma consequência da alteração na formação da base lipídica. No entanto, existe uma via alternativa ou adicional para a síntese de citocinas que pode ser afetada pelas estatinas.

A via do mevalonato mediada pela HMG-CoA redutase é crucial para biossíntese de isoprenóides (92), os quais são essenciais para a atividade e proliferação normal da célula. O farnesil pirofosfato é um intermediário tardio desta via e serve como um precursor para a síntese de vários isoprenóides – por exemplo, grupo geranylgeranyl ou farnesil – os quais prenilam proteínas através de ligações covalentes. Este pode ancorar estas proteínas na base lipídica (82). Muitas proteínas preniladas têm um papel importante na regulação do crescimento celular, secreção celular e transdução de sinais. Desta forma, inibindo a prenilação, as estatinas afetam muitos processos celulares envolvidos na inflamação (76, 81, 82).

O estresse oxidativo é um fator de extrema relevância que influencia a função endotelial. As estatinas apresentam a capacidade de proteger células e tecidos de danos oxidativos, tendo sido demonstrada a sua atividade antioxidante em estudos realizados em tecidos e modelos *in vivo* (93, 94). Ainda se sabe pouco dos mecanismos a partir dos quais as estatinas combatem o estresse oxidativo bem como o que lhes confere estas propriedades antioxidantes. Especula-se sobre os seguintes mecanismos: capacidade de inibição de compostos isoprenóides resultantes da via do mevalonato, aumento da produção de óxido nítrico, as suas características anti-inflamatórias (uma vez que a inflamação se encontra relacionada diretamente aos radicais livres de oxigênio), e a redução da produção de radicais livres de oxigênio através da inibição da ativação de NADPH (95-98).

3.3 Tipos de estatinas

Em 1971 descobriu-se que culturas de fungos de *Penicillium citrinum* produzem uma substância que inibe a biossíntese de colesterol. Essa foi o primeiro tipo de estatina a ser estudado, demonstrando o potencial terapêutico dessa classe de fármacos (99). Posteriormente, foi isolada a lovastatina em *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* (72). A indústria farmacêutica tem realizado testes continuamente nas moléculas de estatinas de forma a melhorá-las. Após a lovastatina, seguiu-se outras como a pravastatina e a sinvastatina. Mais tarde, foram introduzidos os novos derivados sintéticos como a atorvastatina. Portanto, as estatinas naturais, derivadas da fermentação fúngica são a sinvastatina e a pravastatina. A atorvastatina resulta de um processo sintético (100). Atualmente, no mercado, há uma maior diversidade de estatinas, variando o seu poder de redução lipídica e as suas características farmacocinéticas tais como: metabolização hepática e meia-vida. A lipossolubilidade é uma

característica essencial, pois a incorporação hepática das estatinas é dependente dessa característica. As estatinas lipofílicas atravessam a membrana celular por difusão passiva, com maior facilidade do que as hidrofílicas, que apresentam um sistema ativo de transporte. Dessa forma, podemos distinguir a pravastatina como fármaco mais hidrossolúvel, quando comparado com a atorvastatina e sinvastatina (93). As estatinas hidrofílicas conferem maior seletividade hepática para a inibição da síntese de colesterol, maior comodidade posológica e um menor potencial de interação (101).

3.4 Hepatotoxicidade

A hepatotoxicidade está diretamente relacionada com a dose administrada durante o tratamento efetuado com as estatinas, podendo resolver-se com a redução ou com a descontinuação do uso do fármaco (102). A progressão para uma falência hepática é extremamente rara, estando, na sua maioria, também relacionada com a conjugação do tratamento com outros fármacos. A incidência verificada é de 1% (103). O aumento da dose administrada, relaciona-se com uma maior redução nos níveis de LDL, porém, é proporcional ao aumento da hepatotoxicidade, ou seja, a hepatotoxicidade das estatinas é dose dependente (104).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos pleiotrópicos de três estatinas (sinvastatina, atorvastatina e pravastatina) sobre parâmetros inflamatórios e oxidativos em pulmões de camundongos tratados com LPS.

4.2 Objetivos específicos

- Investigar o perfil inflamatório por meio de citocinas e quimiocinas por ELISA e qPCR;
- Investigar o perfil oxidativo através de ensaios para estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase e mieloperoxidase) e dano oxidativo (malondialdeído, carbonilação de proteínas, nitrito, hidroperóxidos e lactato desidrogenase);
- Analisar as alterações da função pulmonar;
- Analisar a histoarquitetura pulmonar.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 de 2 meses e 2 semanas de vida, acondicionados em grupos de cinco a seis animais por caixa, no microisolador do laboratório compartilhado (ICB-UFRJ) com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^\circ\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15 min/h. Esse protocolo foi aprovado em um comitê de ética para trabalhos com animais de laboratório (DFBCICB046).

5.2 Desenho experimental

Foram utilizados 55 camundongos C57BL/6 divididos em 5 grupos ($n = 11$) como grupo controle (50 μL salina intra peritoneal – i.p.), grupo LPS (10 mg/kg LPS i.p.), grupo sinvastatina (20 mg/kg/dia) mais LPS (LPS+S), grupo atorvastatina (10 mg/kg/dia) mais LPS (LPS+A), grupo pravastatina (5 mg/kg/dia) mais LPS (LPS+P). Os grupos que receberam estatinas foram pré-tratados por 3 dias consecutivos, sendo este fármaco administrado via i.p. No terceiro dia de administração das estatinas, todos os grupos, exceto o de controle, receberam LPS via i.p. 24h após a administração de LPS, uma parte ($n = 5$) dos camundongos foi sedada e anestesiada para realização de análise da função pulmonar e, em seguida, realizada a eutanásia (Figura 7). A outra parte ($n = 6$) dos camundongos foi usada para análises bioquímicas e morfológicas.

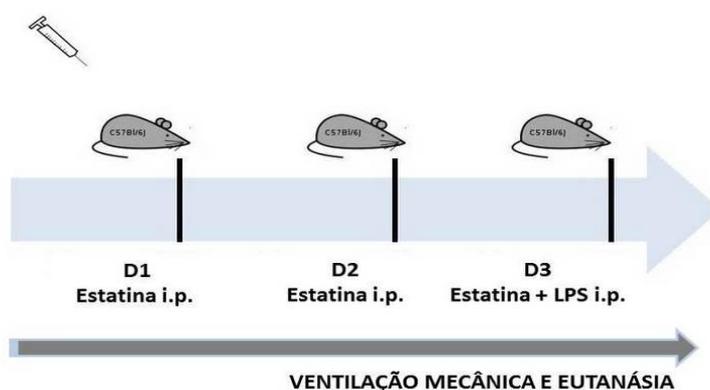


Figura 7 – Desenho experimental.

5.3 Lavado broncoalveolar (LBA)

Para a contagem do número total de leucócitos foi realizado um LBA, através de canulação da traquéia do camundongo e posterior lavagem do sistema respiratório com 1,5 mL de solução salina. Após obtenção do total de células por camundongo, os pulmões foram homogeneizados e estocados em freezer (-80°C). Uma pequena porção do pulmão direito foi colocada em formol para posterior análise morfológica. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford.

5.4 qPCR

O RNA total proveniente do homogeneizado tecidal (pulmão direito), foi isolado utilizando-se um kit de RNeasy (QIAGEN). O DNA de fita simples foi sintetizado a partir de um kit de cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado através de um Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o número de ciclos foi determinado utilizando um Software RQ (Applied Biosystems). A expressão de IL-6 (5': CCGGAGAGGAGACTTCACAG 3' TCCACGATTTCCCAGAGAAC), MCP-1 (5': TAGCCAGGAGGGAGAACAGA 3' TTTTCTGGAGGGAGATGTGG), SOD (5': TCAATGGTGGGGGACATATT 3' GCTTGATAGCCTCCAGCAAC), CAT (5': CCTCGTTCAGGATGTGGTTT 3' TCTGGTGATATCGTGGGTGA), foram examinados e normalizados para os genes constitutivos β -actina (5': GCTACAGCTTCACCACCACA 3' TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT) e HPRT1 (5': GCTACAGCTTCACCACCACA 3' TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT) e calculados de acordo com a fórmula $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$.

5.5 ELISA

Os níveis da citocina IL-6 e MCP-1 no homogeneizado tecidual foram analisados por ensaio de ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (R&D Systems), seguindo as instruções do fabricante.

5.6 Catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD)

Alíquotas de homogeneizados pulmonares foram utilizadas nos ensaios bioquímicos para parâmetros de estresse oxidativo por métodos espectrofotométricos. A concentração de CAT produzida pelas células foi mensurada em resposta à quantidade de H₂O₂ administrado durante a análise e foi lida em um comprimento de onda de 240 nm (105). A atividade da enzima SOD foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina e lida em um comprimento de onda de 480 nm (106).

5.7 Ensaio de mieloperoxidase

Determinou-se a atividade de mieloperoxidase pela adição de brometo de hexadeciltrimetilamônio e ácido trimetoxibenzóico (107). As absorbâncias foram determinadas a 630nm usando um leitor de microplaca (modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

5.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de proteínas

Para medir o índice de peroxidação lipídica utilizou-se o TBARS durante uma reação ácido-aquecimento como descrito por Draper e Hadley (108). TBARS foram determinadas por absorbância a 535 nm e foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA nM/mg de proteína).

O dano oxidativo das proteínas foi avaliado pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrophenylhidrazine (DNPH), como descrito anteriormente por Levine e colaboradores (109). O conteúdo de carbonil em proteínas foi determinado com a absorbância a 370 nm usando-se um coeficiente de absorção molar de 220.000 M⁻¹ e foram expressos como derivados carbonílicos (carbonila nM / mg de proteína).

5.9 Nitrito

Os níveis de nitrito no homogeneizado tecidual foram determinados por um método baseado na reação de Griess (110). Um total de 100 µL de amostra foi misturada a 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1% e naftiletlenodiamina 0,1% em 5% de ácido fosfórico)

e incubadas em temperatura ambiente por 10 min seguido por leitura da absorbância a 550 nm. Concentrações de nitrito nas amostras foram determinadas a partir de uma curva padrão gerada por diferentes concentrações de nitrito de sódio.

5.10 Função pulmonar

Os animais foram sedados com diazepam (1 mg/kg i.p.) e anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg de peso i.p.). A traquéia foi canulada e os animais paralisados (brometo de pancurônio, 1.3 mg. kg i.p.) e ventilados com uma frequência de 100 ciclos por minuto, fluxo ventilatório constante de 10 ml/s e volume corrente de 2 ml por meio de um ventilador artificial (Samay VR15). Um pneumotacógrafo foi conectado à cânula traqueal para as mensurações de fluxo respiratório. Pode-se determinar, por um transdutor de pressão referencial, pneumotacógrafo (Voldyne MP45-2), o gradiente de pressão e a pressão transpulmonar. A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração, o que permitiu analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico do sistema respiratório (111). A resistência do pulmão ($\Delta P1$) e viscoelástico / heterogêneos ($\Delta P2$), assim como a queda de pressão total após a interrupção do fluxo ($\Delta P_{tot} = \Delta P1 + \Delta P2$), pulmão estática (Est) e dinâmica (Edyn) elastâncias, bem como ΔE (Edyn - EST) foram calculadas pelo método da oclusão ao final. O $\Delta P1$ seletivamente reflete a resistência das vias aéreas e $\Delta P2$ reflete relaxamento da tensão, ou propriedades viscoelásticas do pulmão. Mecânica pulmonar foram medidos 10-15 vezes em cada animal.

5.11 Histologia

Para análise histológica, os pulmões foram incubados com solução fixadora (10% de formalina tamponada neutra) por 12-24 h. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol, diafinizados em xileno, incluídos em parafina, e foram feitos cortes histológicos a partir dos blocos com 5 micrômetros de espessura e corados com hematoxilina-eosina. A avaliação histológica foi realizada de forma cega e julgada por dois observadores independentes para garantir que os dados apresentados fossem representativos.

5.12 Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ diferença significativa. GraphPad Prism 5 foi utilizado o software de análise estatística (GraphPad Prism versão 5.0, em San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Efeitos das estatinas sobre o influxo de leucócitos

O LBA foi utilizado para avaliar a contagem de leucócitos como um fator independente de inflamação alveolar (Figura 8). Nos animais injetados com LPS, o total de leucócitos aumentou 83% quando comparado a animais do grupo controle ($p < 0,01$). O pré-tratamento com pravastatina reduziu em 44% o número de leucócitos ($p < 0,001$), assim como o pré-tratamento com sinvastatina (39%, $p < 0,05$) em comparação ao grupo LPS. Não observamos redução significativa no grupo tratado com atorvastatina em relação ao número de leucócitos.

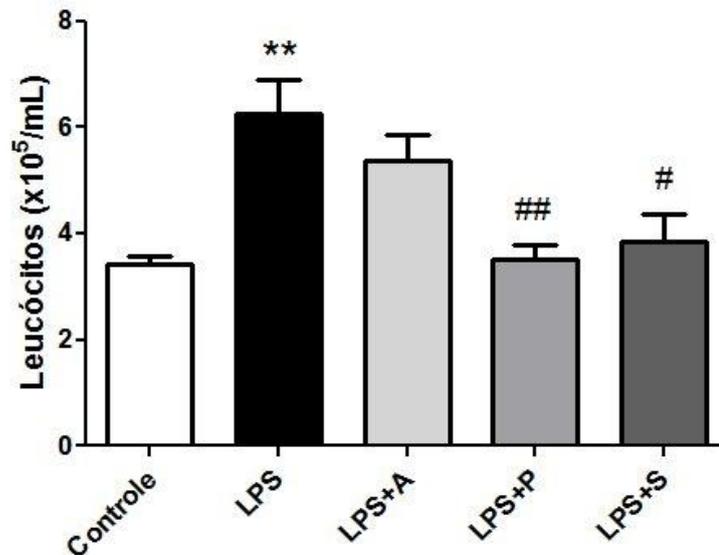


Figura 8 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

6.2 Efeitos das estatinas sobre a expressão e quantidade de citocina/quimiocina pró-inflamatória

A expressão gênica de MCP-1 aumentou 207% ($p < 0,01$) no grupo LPS enquanto IL-6 aumentou 171% ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (figura 9). Atorvastatina e sinvastatina apresentaram redução da expressão gênica de MCP-1 em 59% ($p < 0,05$) e 57% ($P < 0,01$), respectivamente, quando comparados ao grupo LPS. Atorvastatina, pravastatina e sinvastatina apresentaram redução da expressão gênica de IL-6 de 57% ($p < 0,01$), 50% ($p < 0,05$) e 67% ($p < 0,01$) respectivamente quando comparados ao grupo LPS.

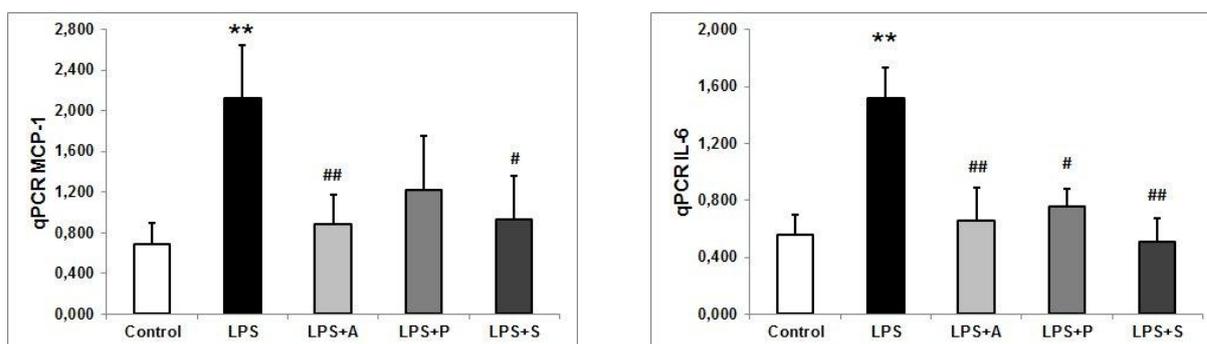


Figura 9 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

Com relação aos níveis proteicos de MCP-1 no pulmão houve um aumento aproximado de 10 vezes ($p < 0,001$) entretanto nos níveis de IL-6 houve um aumento de quase 2 vezes ($p < 0,01$) em comparação ao grupo controle (Figura 10). O pré-tratamento com pravastatina reduziu os níveis proteicos de MCP-1 em 74% ($p < 0,01$) enquanto a redução observada na IL-6 foi de 48% ($p < 0,01$) em comparação com o grupo LPS. O pré-tratamento com sinvastatina reduziu os níveis proteicos de IL-6 em 41% ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo LPS.

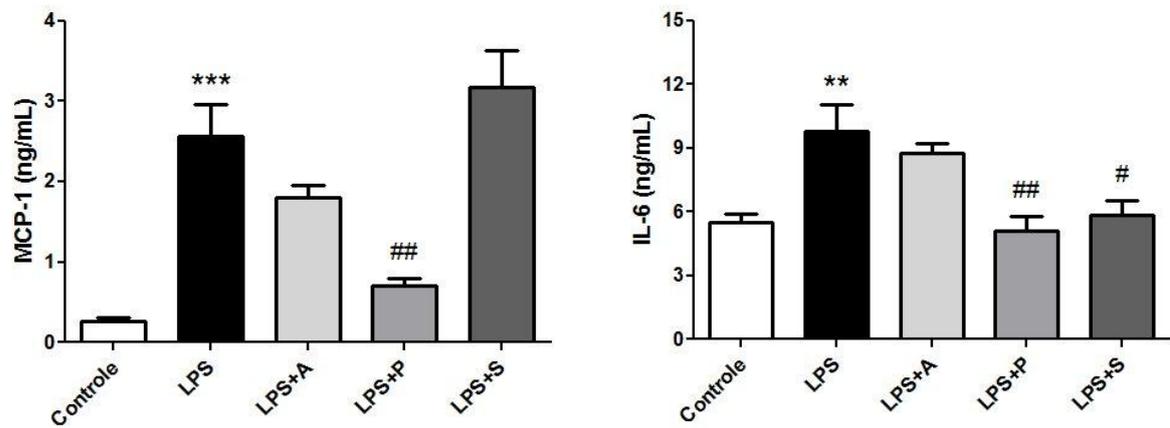


Figura 10 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

6.3 Efeitos das estatinas sobre a atividade de mieloperoxidase e quantidade de nitrito

A atividade de MPO no homogeneizado de pulmão foi utilizada como um marcador de lesão pulmonar aguda relacionada ao acúmulo de neutrófilos. Nós observamos que os camundongos injetados com LPS apresentaram um aumento da atividade de MPO de 283% ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo controle (Figura 11). O pré-tratamento com pravastatina reduziu a atividade de MPO em 44% ($p < 0,01$) enquanto comparado com o grupo LPS. Não observamos diferença significativa em relação às outras estatinas para a atividade de MPO. A quantidade de nitrito no BAL foi analisada aqui como um indicativo indireto da ação do $\text{NO}\cdot$ (Figura 11). Nós observamos um aumento dos níveis de nitrito no grupo LPS de 63% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Nenhuma das estatinas reduziu os níveis de nitrito quando comparado ao grupo LPS.

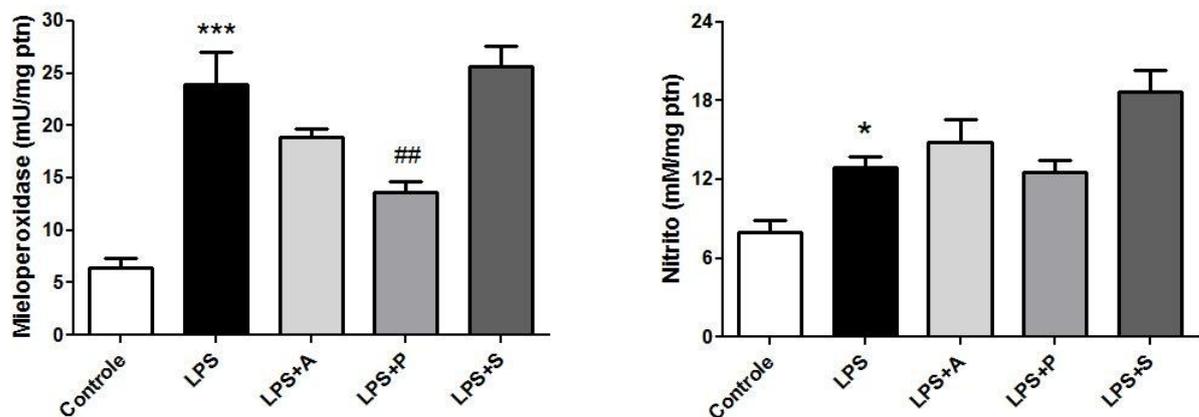


Figura 11 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

6.4 Efeitos das estatinas sobre a expressão e atividade de superóxido dismutase e catalase

Nós observamos um aumento na expressão gênica da SOD no grupo tratado com LPS de aproximadamente 7 vezes ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle (figura 12). Entretanto, nenhuma das estatinas reduziu a expressão gênica de SOD quando comparadas ao grupo LPS. Quanto à expressão gênica de CAT, observamos um aumento de aproximadamente 7 vezes ($p < 0,05$) no grupo LPS em comparação ao grupo controle (Figura 12). O pré-tratamento com atorvastatina e pravastatina reduziu a expressão gênica de CAT em 77% ($p < 0,01$) e 53% ($p < 0,05$) respectivamente, em comparação com o grupo LPS.

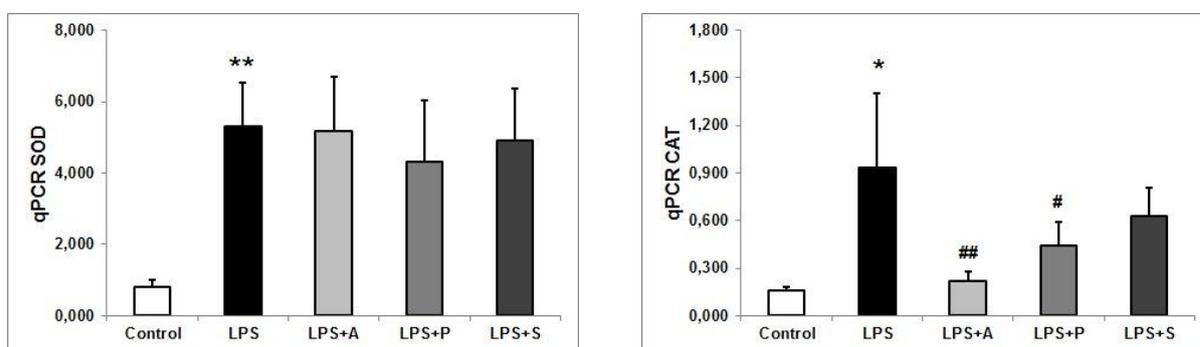


Figura 12 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, # $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

A atividade de SOD aumentou no grupo LPS em 83% ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo controle (Figura 13). Somente o pré-tratamento com atorvastatina reduziu (40%, $p < 0,05$) a atividade de SOD quando comparado ao grupo LPS. Já a atividade de CAT aumentou no grupo LPS em 60% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (figura 13). Somente o pré-tratamento com atorvastatina reduziu (41%, $p < 0,01$) a atividade de CAT quando comparado ao grupo LPS. A capacidade antioxidante total do tecido foi reduzida no grupo LPS em 30% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. Nenhuma das estatinas foi capaz de restaurar a capacidade antioxidante total do tecido em comparação ao grupo LPS, apesar da atorvastatina ter uma tendência de equiparação ao grupo controle.

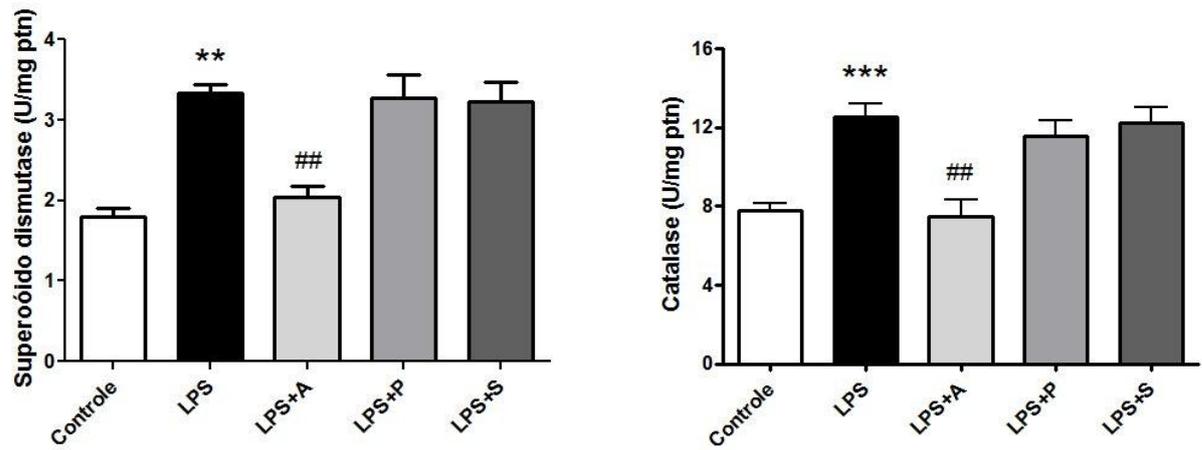


Figura 13 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e ## $p < 0,01$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

6.5 Efeitos das estatinas sobre os marcadores de dano oxidativo

Os marcadores de dano oxidativo são bioprodutos estáveis (como o carbonil, hidroperóxidos, malondialdeído e lactato desidrogenase) que podem ser detectados após a ação exagerada de ERO/ERN. Nós observamos um aumento de 145% ($p < 0,05$) nos níveis de carbonilação de proteínas no grupo LPS quando comparado ao grupo controle (Figura 14). Nenhuma das estatinas reduziu a carbonilação de proteínas, apesar de a atorvastatina apresentar uma tendência de diminuição (34%) em relação ao grupo LPS. Os níveis de hidroperóxidos aumentaram no grupo LPS em 81% ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo controle (Figura 14). O pré-tratamento com atorvastatina, pravastatina e sinvastatina reduziu esses níveis em até 38% ($p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) quando comparados ao grupo LPS. Os níveis de malondialdeído aumentaram em 80% ($p < 0,01$) no grupo LPS quando comparado ao grupo controle (Figura 15). O pré-tratamento com atorvastatina, pravastatina e sinvastatina reduziu os níveis de malondialdeído em até 41% ($p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$) quando comparados ao grupo LPS. Finalmente, a atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi maior (300%, $p < 0,01$) no grupo LPS que no grupo controle (Figura 15). Entretanto, nenhuma das estatinas reduziu significativamente a atividade dessa enzima, apesar da atorvastatina (35%) e pravastatina (34%) apresentarem uma tendência de diminuição em relação ao grupo LPS.

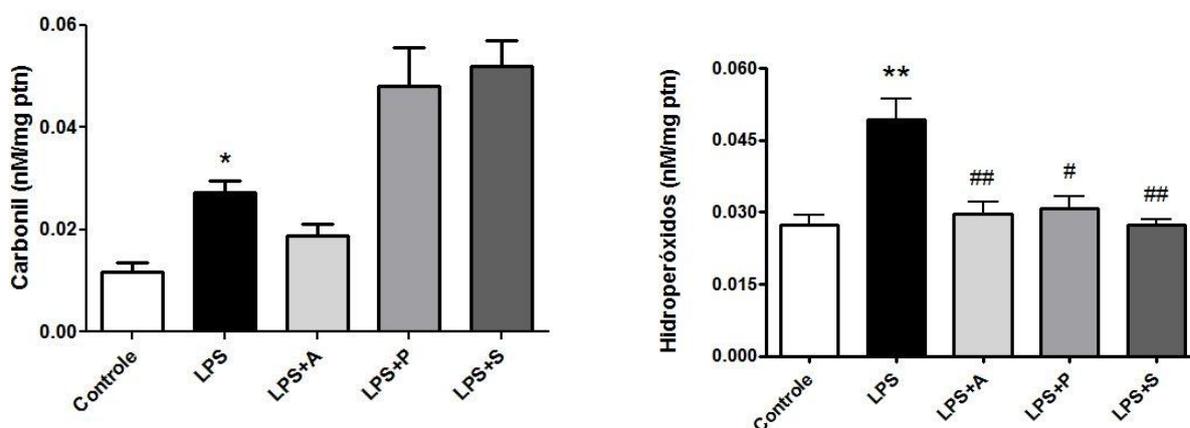


Figura 14 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

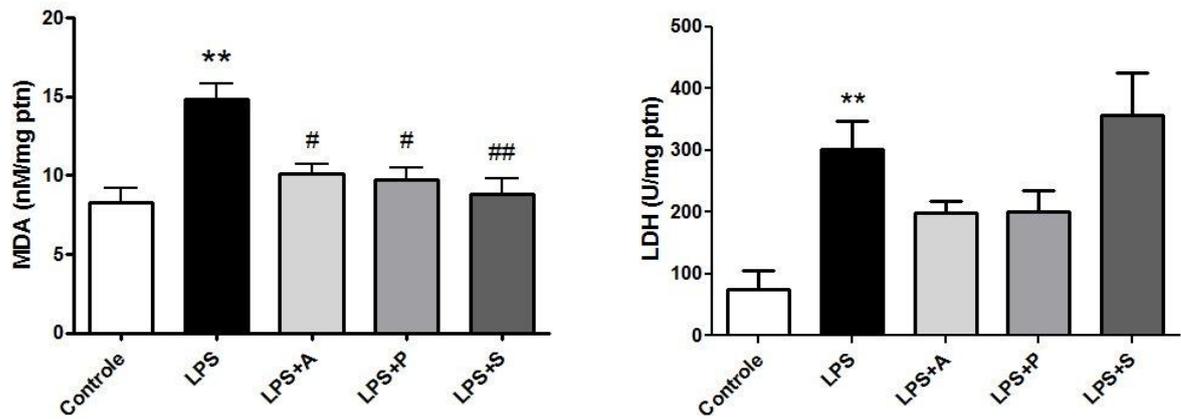


Figura 15 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

6.6 Efeito das estatinas sobre a função pulmonar

Os parâmetros da função respiratória foram determinados 24 horas após a administração de LPS ou veículo. Nós observamos que o grupo LPS apresentou um aumento da elastância estática ($p < 0,01$), da resistência total das vias aéreas ($p < 0,05$) e da pressão total do sistema respiratório ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (figura 16). O pré-tratamento com atorvastatina ($p < 0,05$) e pravastatina ($p < 0,01$) reduziu a elastância estática em comparação ao grupo LPS, enquanto o pré-tratamento com sinvastatina não alterou esse resultado. Quanto à resistência total das vias aéreas e da pressão total do sistema respiratório, o pré-tratamento com estatinas não apresentou redução significativa em comparação ao grupo LPS, apesar do pré-tratamento com atorvastatina e em menor grau com pravastatina apresentarem tendência de diminuição nesses parâmetros.

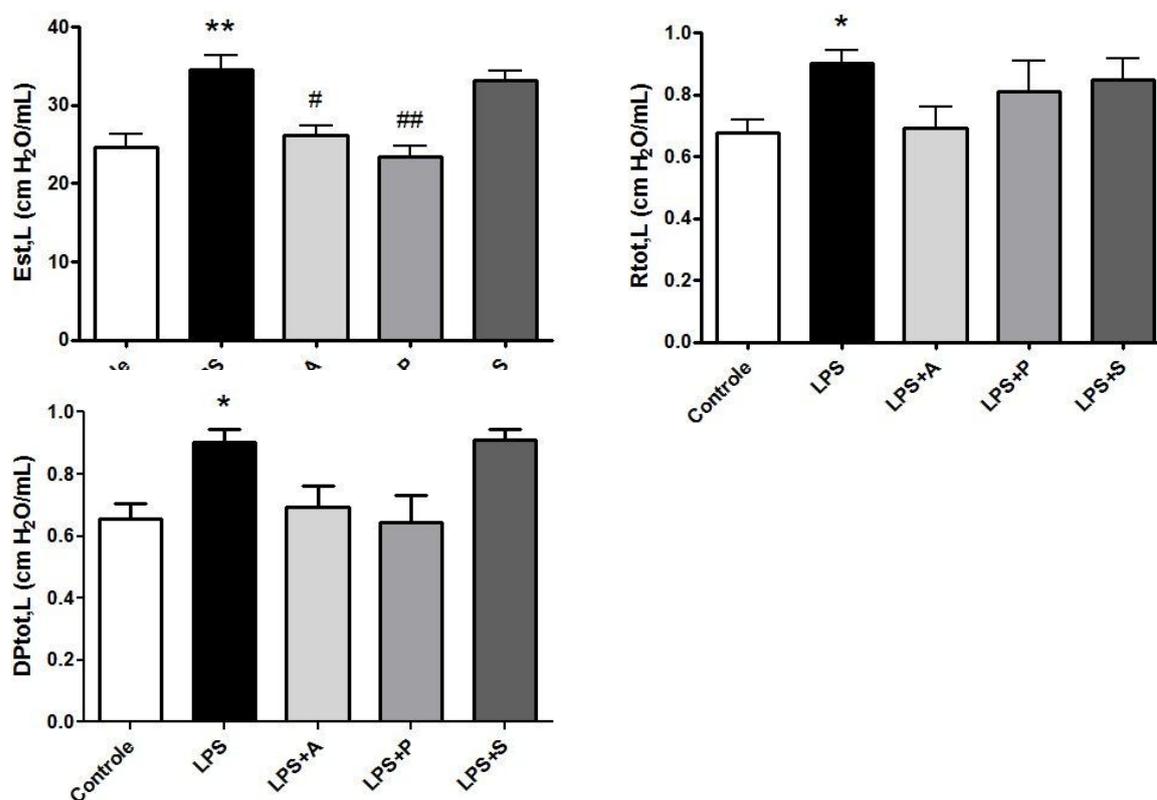


Figura 16 - Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos significam ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle. # em relação ao grupo LPS.

6.7 Efeitos das estatinas sobre o perfil histopatológico do pulmão

A análise histopatológica revelou que os camundongos controles apresentaram septo alveolar íntegro e alvéolos normais (figura 17). Poucas células inflamatórias foram observadas no interior dos alvéolos. Não observamos hemorragia, congestão e colapso em nenhuma das lâminas analisadas (a). O grupo LPS apresentou áreas de edema de septo alveolar, hemorragia sem congestão e colapso do parênquima. Muitas células inflamatórias foram observadas nos alvéolos (b). O grupo LPS+A apresentou áreas de edema de septo alveolar, em menor grau em comparação ao grupo LPS, algum grau de hemorragia, sem congestão e sem colapso do parênquima. Poucas células inflamatórias foram observadas nos alvéolos (c). O grupo LPS+P apresentou áreas de edema de septo alveolar, em menor grau em comparação ao grupo LPS, algum grau de hemorragia, sem congestão e sem colapso do parênquima. Células inflamatórias foram observadas nos alvéolos (d). O grupo LPS+S apresentou pequenas áreas de edema de septo alveolar em comparação ao grupo LPS, sem hemorragia, congestão ou colapso do parênquima. Poucas células inflamatórias foram observadas nos alvéolos (e).

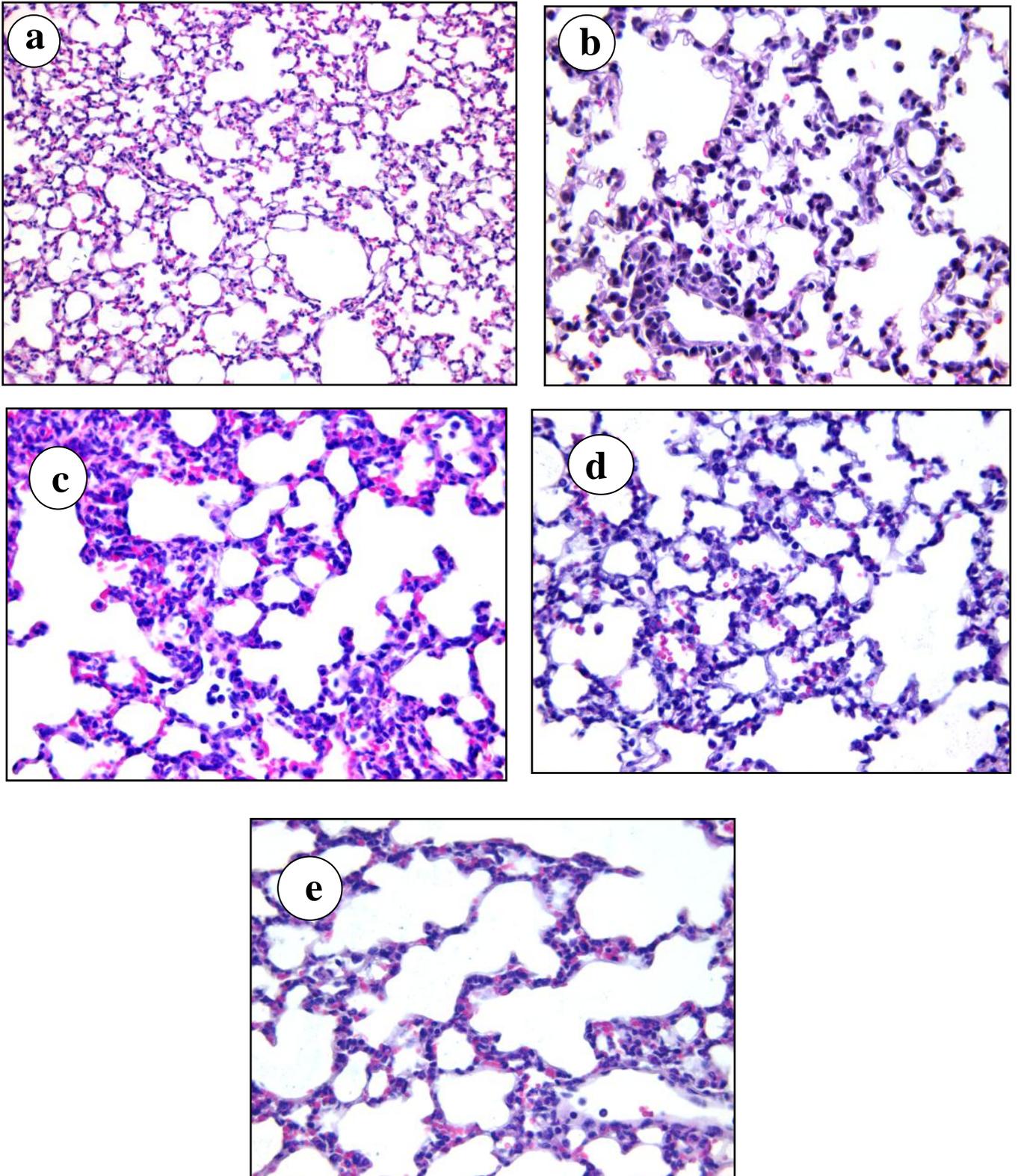


Figura 17 – Hematoxilina & eosina capturadas em objetiva de 40x.

7 DISCUSSÃO

O lipopolissacarídeo é um constituinte da parede celular de bactérias gram negativas contribuindo para a inflamação local e toxicidade sistêmica (35-37, 64). Os modelos experimentais usando endotoxina, tal como o LPS, são amplamente aplicados para estudo de lesão inflamatória pulmonar (23, 24, 61, 64). A liberação de fatores prejudiciais à linfa mesentérica contribui para a lesão pulmonar e inflamação sistêmica após choque e trauma (11). A endotoxemia induzida pela administração de LPS intraperitoneal leva a uma lesão pulmonar e ativação de neutrófilos. A ativação de neutrófilos, além de seu importante papel defensivo, provoca produção de radicais livres. O desequilíbrio redox, resultante do aumento destes radicais livres em detrimento a uma redução na produção do sistema antioxidante pode gerar dano tecidual (55, 60, 69). Segundo nosso estudo, as estatinas além de seus efeitos hipolipemiantes possuem efeitos pleiotrópicos tais como capacidade anti-inflamatória e antioxidante.

No presente estudo, observamos um aumento na contagem de leucócitos no LBA no grupo LPS em relação ao controle, o qual foi reduzido com a administração prévia de pravastatina e simvastatina, mas não com a atorvastatina. Nós também observamos neste mesmo grupo que houve um aumento tanto na expressão gênica quanto nos níveis de MCP-1 e IL-6 em homogeneizado pulmonar. A pravastatina reduziu os níveis proteicos de MCP-1 e IL-6 não alterando a expressão gênica de MCP-1, mas apenas da IL-6. A simvastatina reduziu os níveis de proteínas de IL-6 e alterou a expressão tanto de MCP-1 quanto de IL-6. A atorvastatina não gerou mudanças nos níveis destas citocinas, mas reduziu a expressão das mesmas. O fato é que as estatinas exercem ação anti-inflamatória, especialmente nas células endoteliais, por inibição da ativação endotelial, isto é, inibição da ativação de NFκB, inibição na expressão de ICAM-1, na produção de citocina (IL-6) e quimiocina (MCP-1) e por prevenção de aderência de leucócitos no endotélio (75, 83, 93, 95). Elevada expressão de MCP-1 e IL-6 assim como aumento dos níveis desses mediadores inflamatórios são encontrados na síndrome coronariana aguda (74). Cabe ressaltar que o ponto chave da lesão pulmonar aguda é a lesão da barreira hematoaérea, ou seja, lesão do endotélio vascular pulmonar e lesão da membrana basal alveolar, onde neutrófilos aderem à parede do endotélio lesado e migram para o espaço aéreo (9, 11, 12).

Um trabalho sobre os benefícios microvasculares e efeitos anti-inflamatórios da pravastatina mostrou uma redução no extravasamento macromolecular e adesão leucocitária

publicou um trabalho onde observou o efeito da sinvastatina na interação entre leucócitos e no mesentério de ratos 2-4 horas após indução de endotoxemia por LPS (95). Pruefer publicou um trabalho onde observou o efeito da sinvastatina na interação entre leucócitos e células endoteliais através de microscopia intravital *in vivo*. Ele concluiu com este trabalho que a sinvastatina inibiu o rolamento, a adesão e a transmigração de leucócitos em estados inflamatórios agudos e que este efeito estaria relacionado com a “*downregulation*” da expressão da P-selectina nas células endoteliais (112). Nós não achamos diferença na redução de leucócitos no grupo tratado com atorvastatina, embora dados da literatura mostrem o contrário (113, 114). Em outro trabalho, dessa vez realizado por Gaugler e colaboradores com cultura de células endoteliais de pulmões de humanos, foi administrado pravastatina (1-1000 µM, concentração final) com o objetivo de limitar a resposta inflamatória e trombótica endotelial após irradiação, e observou-se uma inibição na excessiva produção de MCP-1, IL-6 e IL-8 (115).

Com relação à expressão de MCP-1, nossos dados divergem da literatura. Em um artigo publicado por Egashira e colaboradores, foi avaliado o efeito da pravastatina na inflamação cardiovascular em ratos em um modelo de inibição crônica da síntese de NO• por L-NAME. Foi observado um aumento na infiltração de monócitos e na expressão MCP-1 dentro das artérias coronárias após o terceiro dia de administração de L-NAME. O tratamento prévio com pravastatina atenuou a expressão gênica desta quimiocina (116). Entretanto, apesar de o modelo ser diferente do nosso, a dose de pravastatina ofertada neste estudo foi bem maior do que a que ofertamos em nosso modelo. A pravastatina foi utilizada 2 dias antes do L-NAME em doses progressivas; 50, 100 e 250 mg/kg/dia, também via i.p., enquanto, em nosso modelo, utilizamos 5 mg/kg.

Nos grupos atorvastatina e sinvastatina, foi observado o contrário do grupo pravastatina, isto é, redução na expressão de MCP-1, porém, nenhuma mudança nos níveis desta quimiocina. Tais diferenças podem estar ligadas à classe de estatinas, já que tanto a atorvastatina quanto a sinvastatina são estatinas lipofílicas (99). Apesar disso, observamos um resultado diferente entre as estatinas lipofílicas quanto aos níveis de IL-6, já que a sinvastatina reduziu os níveis desta citocina e a atorvastatina não. Diferentes famílias de estatinas podem ter diferentes funções bioquímicas mesmo dentro da mesma classe, assim como existe um efeito dose-resposta o que pode diferenciar seu potencial terapêutico (76, 82). Podemos ter como exemplo, o trabalho de Turner e colaboradores no qual avaliaram 4 tipos de estatinas lipofílicas (sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina e lovastatina) e 1 hidrofílica (pravastatina) em relação à capacidade de hiperplasia da íntima da veia safena, de forma a atenuar a invasão

e proliferação das células musculares lisas (117). Eles observaram que as estatinas lipofílicas reduziram a proliferação destas células na seguinte ordem de potência de redução: fluvastatina > atorvastatina > sinvastatina > lovastatina. Ao contrário, a hidrofílica pravastatina não obteve nenhum efeito estatístico. Assim como a sinvastatina e pravastatina que também reduziram tanto a expressão quanto os níveis de IL-6. Iwata e colaboradores utilizaram 2 tipos de estatinas, uma lipofílica (pitavastatina) e outra hidrofílica (pravastatina) e examinou o efeito destas estatinas na produção de citocinas nas células epiteliais brônquicas humanas estimuladas por LPS (118). A expressão das IL-6 e IL-8 foram inibidas de forma significativa por ambas as estatinas; porém essa inibição foi anulada quando adicionado mevalonato, sugerindo que os efeitos anti-inflamatórios pudessem estar ligados à cascata mevalônica.

O bloqueio da HMG-CoA redutase pelas estatinas depleta moléculas derivadas do ácido mevalônico, incluindo os isoprenóides, levando a uma redução no acúmulo intracelular de proteínas isopreniladas. A ativação da família da proteína Ras, proteína G implicada à transdução de sinais para diferentes receptores, depende da sua ligação covalente a um isoprenil de 15 carbonos, levando à ativação da transcrição através da ativação de NFκB (76, 82, 93). Seguindo essa linha de pensamento, Ortego e colaboradores, por meio da administração de manumicin A, um antibiótico que atua como inibidor seletivo da Ras farnesiltransferase, observaram uma inibição da atividade de NFκB, a qual foi ativada previamente por angiotensina 2 e TNF-α (119). Entretanto, farnesil pirofosfato e geranylgeranyl pirofosfato, isoprenóides necessários para isoprenilação proteica, revertem a atividade de NFκB. Muitos fatores que participam da resposta inflamatória são ativados por NFκB. Esta ativação por sua vez leva à expressão coordenada de gens diferentes que codificam proteínas, tais como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas envolvidas na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória (28, 29). Em nosso modelo, observamos redução na expressão de MCP-1 e IL-6, embora essa redução não tenha sido harmonicamente observada em todas as estatinas testadas. Sugerimos que tal modulação possa estar relacionada com a inibição da via do mevalonato interferindo, dessa maneira, na síntese de isoprenóides e, conseqüentemente, a inibição de NFκB.

Esses dados se complementam ao analisar os resultados obtidos no homogeneizado pulmonar de MPO. Notamos uma maior quantidade de MPO no grupo LPS quando comparado ao controle. Este fato sugere que o acúmulo observado de leucócitos no LBA provavelmente foi, em sua maior parte, derivados de neutrófilos. O pré-tratamento com pravastatina causou uma redução significativa desta quantidade. Em um estudo prévio, no qual se observou o efeito protetor da pravastatina na lesão pulmonar aguda induzida por LPS,

foram reportados efeitos semelhantes. O grupo pré-tratado com pravastatina produziu uma redução significativa não apenas ao extravasamento vascular pulmonar induzido por LPS, mas também no infiltrado celular no tecido pulmonar, incluindo redução na atividade de MPO (120). Em nosso estudo, não foi visto nenhuma alteração neste marcador com a administração prévia de atorvastatina e sinvastatina. Como mencionado anteriormente, talvez este resultado possa estar relacionado com a dose implementada e com o tempo de utilização da mesma, já que, em nosso estudo, os grupos tratados receberam as estatinas por apenas 3 dias. Um estudo realizado em humanos, onde se utilizou atorvastatina em dose elevada (40 mg/dia) e o impacto desta terapia na migração transendotelial de neutrófilos, notou-se uma redução importante na migração após 2 semanas de administração desta terapia (114). O mesmo pode ocorrer com relação à dose na sinvastatina, já que estas duas estatinas, atorvastatina e sinvastatina, fazem parte da mesma classe de estatinas lipofílicas, diferentemente da pravastatina, que faz parte da classe de estatinas hidrofílicas.

A atividade de leucócitos pode também produzir e liberar EROs, causando um aumento de oxidantes no pulmão. Caso o sistema antioxidante do pulmão não proporcione proteção adequada, condições de estresse oxidativo ocorrerão com possíveis danos aos tecidos. Consequentemente, dano em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem ser detectados como produtos do dano oxidativo (40). As estatinas possuem efeitos antioxidantes que parecem ser independentes do colesterol (93-98). Nós investigamos a expressão e atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em homogeneizado de pulmão, assim como marcadores de dano oxidativo tais como carbonil, hidroperóxidos, malondialdeído, lactato desidrogenase e nitrito. O grupo que foi estimulado com LPS apresentou uma elevada expressão da SOD e CAT. Nenhuma diferença foi observada nos grupos tratados com as estatinas para expressão gênica de SOD, porém, com relação à CAT, houve redução nos grupos atorvastatina e pravastatina, mas não na sinvastatina. Apenas o grupo pré-tratado com atorvastatina apresentou redução na atividade tanto da SOD e CAT quanto na redução do dano oxidativo, observada nos níveis de malondialdeído e hidroperóxidos além de uma tendência a redução nos níveis de carbonil. Nenhuma estatina avaliada reduziu os níveis de lactato desidrogenase, talvez, por esta enzima ter uma meia vida extremamente curta. Finalmente, o nitrito não foi menor em nenhum grupo tratado com estatinas do que o grupo LPS. É válido lembrar que diferenças nas propriedades farmacológicas das estatinas podem causar diferentes ações antioxidantes. O tempo de tratamento também pode interferir na ação de cada droga com relação a sua potência de tratamento.

Nós sugerimos que o estresse oxidativo notado nesse estudo é parcialmente devido ao aumento no número de leucócitos. Tanto no LBA quanto no homogeneizado de pulmão do grupo controle não foram observados os mesmos resultados do grupo LPS. Observamos um aumento no número de leucócitos no LBA dos camundongos estimulados com LPS, principalmente neutrófilos, devido aos elevados níveis de MPO. Leucócitos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias e liberam EROs e ambas, citocinas e EROs estão implicadas no processo de fosforilação do complexo inativo I κ B-NF κ B (40, 49). Um trabalho publicado por Hilgendorff e colaboradores constatou que as estatinas diferem na sua potência em interferir na ativação da sinalização de NF κ B em monócitos humanos (121). Eles estudaram 6 tipos de estatinas diferentes, 3 das quais utilizamos em nosso estudo. Todas as estatinas inibiram a atividade de NF κ B induzida por LPS de maneira dose dependente e esse efeito foi dependente do mevalonato, sugerindo da mesma forma, que tais efeitos possam estar ligados a cascata mevalônica.

Uma pesquisa realizada com 114 pacientes com dislipidemia, no qual foram utilizadas as mesmas estatinas, isto é, atorvastatina, sinvastatina e pravastatina, teve como objetivo avaliar as atividades das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) em eritrócitos. Após o tratamento, que durou de 4 a 12 semanas, foi observado um aumento significativo na atividade das enzimas antioxidantes nos pacientes que utilizaram atorvastatina e sinvastatina. A terapia com pravastatina teve impacto apenas na atividade da CAT, sem nenhum efeito na GPx e na SOD (122). Nós não observamos os mesmos resultados em nosso modelo de estudo. Apenas o grupo que utilizou atorvastatina apresentou redução na atividade destas enzimas quando comparado ao grupo LPS.

Endotoxina induzindo LPA é associada a mudanças na mecânica respiratória representada pela redução na complacência dinâmica e aumento na resistência pulmonar. As mudanças na mecânica têm sido atribuídas ao edema pulmonar seguido por déficit na troca gasosa e constricção das vias aéreas (123). Observamos neste estudo uma forte correlação entre os parâmetros encontrados na função respiratória e a severidade da inflamação encontrada no grupo LPS no que diz respeito, principalmente, à contagem de leucócitos no LBA, a quantidade de citocinas presentes no homogeneizado neste grupo e ao seu perfil histopatológico. Nossos achados mostram que os grupos pré-tratados com pravastatina e atorvastatina reduziram a elastância pulmonar em relação ao grupo LPS. Além desse parâmetro da função pulmonar, houve uma tendência à redução no grupo atorvastatina em relação à resistência das vias aéreas, e do grupo pravastatina em relação à pressão do sistema respiratório. O grupo pravastatina alcançou resultados mais favoráveis do que o grupo

atorvastatina no que diz respeito aos marcadores inflamatórios: contagem de leucócitos, na produção de MCP-1, IL-6 e MPO. Além do mais, o perfil histopatológico apresentado pela pravastatina foi melhor do que a atorvastatina quando comparado ao grupo LPS.

Num modelo de endotoxina induzindo LPA foram examinada as relações entre mecânica pulmonar e edema pulmonar ao longo do tempo (124). Os autores observaram um aumento na resistência pulmonar e diminuição da complacência dinâmica, que ocorreu muito cedo, após a infusão da endotoxina, provavelmente devido ao edema pulmonar. Seguindo esta linha de pensamento, o presente estudo não mostrou nenhuma correlação entre elastância e edema alveolar. Outro estudo analisou o pré-tratamento com atorvastatina na LPA induzida por ventilação mecânica (VM) com elevados volumes correntes em pulmões de coelhos. Eles observaram que a atorvastatina melhorou a permeabilidade alvéolo-capilar e reduziu a LPA causada pela VM (125). Constatamos nesse trabalho que a atorvastatina foi a estatina que obteve o melhor resultado em relação à atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e esse resultado está aliado à redução nos marcadores de dano oxidativo (MDA e hidroperóxido). Sugerimos que o mecanismo pelo qual a atorvastatina possa ter influenciado na elastância pulmonar seja por redução do edema alveolar e por sua capacidade antioxidante, porém, há necessidade de mais pesquisas que fortaleçam esses achados.

8 CONCLUSÃO

Estatinas são drogas comumente usadas para controle/redução do colesterol. Entretanto, já se sabe que existem efeitos pleiotrópicos associados. Nesse estudo, nós identificamos alguns efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de três estatinas – atorvastatina, pravastatina e sinvastatina. Ao que parece, inclusive com relação as análises histológicas e funcionais, a pravastatina se mostrou a melhor opção terapêutica anti-inflamatória, enquanto a atorvastatina se mostrou a melhor opção antioxidante. Esses achados mostram que, apesar de relacionados, a inflamação e o estresse oxidativo tem diferentes vias de sinalização e respostas ao lipopolissacarídeo, e com as doses estudadas, a sinvastatina se mostrou a opção com menor ação anti-inflamatória e antioxidante.

REFERÊNCIAS

1. Avecillas JF, Freire AX, Arroliga AC. Clinical epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: incidence, diagnosis, and outcomes. *Clin Chest Med*. 2006 Dec;27(4):549-57; abstract vii.
2. Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006 Aug;27(4):327-36.
3. Frutos-Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*. 2004 Feb;10(1):1-6.
4. Wind J, Versteegt J, Twisk J, van der Werf TS, Bindels AJ, Spijkstra JJ, et al. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in The Netherlands: a survey. *Respir Med*. 2007 Oct;101(10):2091-8.
5. Yu WL, Lu ZJ, Wang Y, Shi LP, Kuang FW, Qian SY, et al. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in pediatric intensive care units in China. *Intensive Care Med*. 2009 Jan;35(1):136-43.
6. Acute Lung Injury/Adult Respiratory Distress Syndrome. Proceedings from the 3rd Annual Pittsburgh International Lung Conference, Farmington, Pennsylvania, USA, October 16-20, 2004. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(3):181-247.
7. Flaatten H. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit Care*. 2004 Aug;8(4):R180-4.
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*. 2009 Nov;136(5 Suppl):e28.
9. Raghavendran K, Napolitano LM. Definition of ALI/ARDS. *Crit Care Clin*. 2011 Jul;27(3):429-37.
10. Powell FL, Hopkins SR. Comparative physiology of lung complexity: implications for gas exchange. *News Physiol Sci*. 2004 Apr;19:55-60.
11. Bhargava M, Wendt CH. Biomarkers in acute lung injury. *Transl Res*. 2012 Apr;159(4):205-17.
12. Bhatia M, Zemans RL, Jeyaseelan S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 May;46(5):566-72.
13. Hough CL, Herridge MS. Long-term outcome after acute lung injury. *Curr Opin Crit Care*. 2012 Feb;18(1):8-15.
14. Muller MC, Juffermans NP. Transfusion-related acute lung injury: a preventable syndrome? *Expert Rev Hematol*. 2012 Feb;5(1):97-106.
15. Price LC, McAuley DF, Marino PS, Finney SJ, Griffiths MJ, Wort SJ. Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 May;302(9):L803-15.
16. Quilez ME, Lopez-Aguilar J, Blanch L. Organ crosstalk during acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, and mechanical ventilation. *Curr Opin Crit Care*. 2012 Feb;18(1):23-8.

17. Silveyra P, Floros J. Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front Biosci.* 2012;17:407-29.
18. Hall TC, Bilku DK, Al-Leswas D, Horst C, Dennison AR. Biomarkers for the differentiation of sepsis and SIRS: the need for the standardisation of diagnostic studies. *Ir J Med Sci.* 2011 Dec;180(4):793-8.
19. Choban PS, McKnight T, Flancbaum L, Sabourin CL, Bijur GN, Boros LG, et al. Characterization of a murine model of acute lung injury (ALI): a prominent role for interleukin-1. *J Invest Surg.* 1996 Mar-Apr;9(2):95-109.
20. Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, Gregory S, Biffi W, Ayala A. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jan;290(1):L51-8.
21. Szakmany T, Heigl P, Molnar Z. Correlation between extravascular lung water and oxygenation in ALI/ARDS patients in septic shock: possible role in the development of atelectasis? *Anaesth Intensive Care.* 2004 Apr;32(2):196-201.
22. Bellingan GJ. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax.* 2002 Jun;57(6):540-6.
23. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, He M, Yamada M, Takahashi T, et al. Administration of a specific inhibitor of neutrophil elastase attenuates pulmonary fibrosis after acute lung injury in mice. *Exp Lung Res.* 2012 Feb;38(1):28-36.
24. Kossodo S, Zhang J, Groves K, Cuneo GJ, Handy E, Morin J, et al. Noninvasive in vivo quantification of neutrophil elastase activity in acute experimental mouse lung injury. *Int J Mol Imaging.* 2011;2011:581406.
25. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Sawamura A, Hayakawa M, Kato H. Systemic inflammation and disseminated intravascular coagulation in early stage of ALI and ARDS: role of neutrophil and endothelial activation. *Inflammation.* 2004 Aug;28(4):237-44.
26. Wang Z, Chen F, Zhai R, Zhang L, Su L, Lin X, et al. Plasma neutrophil elastase and elafin imbalance is associated with acute respiratory distress syndrome (ARDS) development. *PLoS One.* 2009;4(2):e4380.
27. Kong MY, Li Y, Oster R, Gaggar A, Clancy JP. Early elevation of matrix metalloproteinase-8 and -9 in pediatric ARDS is associated with an increased risk of prolonged mechanical ventilation. *PLoS One.* 2011;6(8):e22596.
28. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Nov;281(5):L1037-50.
29. Pamukcu B, Lip GY, Shantsila E. The nuclear factor-kappa B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb Res.* 2011 Aug;128(2):117-23.
30. Lodes U, Bohmeier B, Lippert H, Konig B, Meyer F. PCR-based rapid sepsis diagnosis effectively guides clinical treatment in patients with new onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surg.* 2012 Mar;397(3):447-55.
31. Fry DE. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *Am Surg.* 2012 Jan;78(1):1-8.
32. Lichtenstern C, Brenner T, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Predictors of survival in sepsis: what is the best inflammatory marker to measure? *Curr Opin Infect Dis.* 2012 Jun;25(3):328-36.
33. Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):290-5.

34. Kitchens RL, Thompson PA. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins. *J Endotoxin Res.* 2003;9(2):113-8.
35. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol.* 2007 Sep;297(5):353-63.
36. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Jan;3(1):36-46.
37. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res.* 2005;11(1):5-11.
38. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012 May;70(5):257-65.
39. McGuigan RM, Mullenix P, Norlund LL, Ward D, Walts M, Azarow K. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat: establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase. *Curr Surg.* 2003 Jul-Aug;60(4):412-7.
40. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Oct;29(4):427-31.
41. Cross CE, Eiserich JP. Oxidative stress in acute lung injury: Deja vu or something new? *Crit Care Med.* 2004 Mar;32(3):892-3.
42. Lange M, Szabo C, Traber DL, Horvath E, Hamahata A, Nakano Y, et al. Time profile of oxidative stress and neutrophil activation in ovine acute lung injury and sepsis. *Shock.* 2012 May;37(5):468-72.
43. Ronchi CF, Fioretto JR, Ferreira AL, Berchieri-Ronchi CB, Correa CR, Kurokawa CS, et al. Biomarkers for oxidative stress in acute lung injury induced in rabbits submitted to different strategies of mechanical ventilation. *J Appl Physiol.* 2012 Apr;112(7):1184-90.
44. Ward PA. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Aug;1203:53-9.
45. Botha P, Jeyakanthan M, Rao JN, Fisher AJ, Prabhu M, Dark JH, et al. Inhaled nitric oxide for modulation of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2007 Nov;26(11):1199-205.
46. Hampl V, Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev.* 2000 Oct;80(4):1337-72.
47. Huffman LJ, Prugh DJ, Millecchia L, Schuller KC, Cantrell S, Porter DW. Nitric oxide production by rat bronchoalveolar macrophages or polymorphonuclear leukocytes following intratracheal instillation of lipopolysaccharide or silica. *J Biosci.* 2003 Feb;28(1):29-37.
48. Strapkova A, Nosalova G. Nitric oxide and airway reactivity. *Bratisl Lek Listy.* 2001;102(8):345-50.
49. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000 Jul;109(1):33-44.
50. Ferrari CK, Souto PC, Franca EL, Honorio-Franca AC. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011 Dec;59(6):441-8.
51. Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. Oxidative stress in phagocytes--"the enemy within". *Microsc Res Tech.* 2002 Jun 15;57(6):441-55.
52. Auerbach A, Hernandez ML. The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2012 Apr;12(2):133-9.
53. Maksimenko AV, Vavaev AV. Antioxidant enzymes as potential targets in cardioprotection and treatment of cardiovascular diseases. *Enzyme antioxidants: the*

38. next stage of pharmacological counterwork to the oxidative stress. *Heart Int.* 2012 Feb 3;7(1):e3.
54. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life.* 2000 Oct-Nov;50(4-5):279-89.
55. Fridovich I, Freeman B. Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:693-702.
56. Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res.* 2005 Nov 11;579(1-2):58-80.
57. Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2005 Jan-Feb;7(1-2):42-59.
58. Quinlan T, Spivack S, Mossman BT. Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environ Health Perspect.* 1994 Jun;102 Suppl 2:79-87.
59. Hirani N, Antonicelli F, Strieter RM, Wiesener MS, Ratcliffe PJ, Haslett C, et al. The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages--a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Mol Med.* 2001 Oct;7(10):685-97.
60. Bernard GR. N-acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):54S-9S.
61. Qiu X, Li H, Tang H, Jin Y, Li W, YuSun, et al. Hydrogen inhalation ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol.* 2011 Dec;11(12):2130-7.
62. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):5944-72.
63. Fritz KS, Petersen DR. Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. *Chem Res Toxicol.* 2011 Sep 19;24(9):1411-9.
64. Aggarwal NR, D'Alessio FR, Tsushima K, Files DC, Damarla M, Sidhaye VK, et al. Moderate oxygen augments lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010 Mar;298(3):L371-81.
65. Perkowski S, Scherpereel A, Murciano JC, Arguiri E, Solomides CC, Albelda SM, et al. Dissociation between alveolar transmigration of neutrophils and lung injury in hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Nov;291(5):L1050-8.
66. Suzuki Y, Aoki T, Takeuchi O, Nishio K, Suzuki K, Miyata A, et al. Effect of hyperoxia on adhesion molecule expression in human endothelial cells and neutrophils. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 1):L418-25.
67. Koh YH, Suzuki K, Che W, Park YS, Miyamoto Y, Higashiyama S, et al. Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H₂O₂ and the induction of HB-EGF via c-Jun NH₂-terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells. *FASEB J.* 2001 Jun;15(8):1472-4.
68. Wang X, Tong M, Chinta S, Raj JU, Gao Y. Hypoxia-induced reactive oxygen species downregulate ETB receptor-mediated contraction of rat pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Mar;290(3):L570-8.
69. Sun R, Wang A, Yan Y, Zhang H. The role of activated neutrophils and free radical in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Chin Med Sci J.* 1993 Mar;8(1):15-9.
70. Waki K, Inanami O, Yamamori T, Nagahata H, Kuwabara M. Involvement of protein kinase C δ in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils. *Free Radic Res.* 2006 Apr;40(4):359-67.
71. Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
72. Stossel TP. The discovery of statins. *Cell.* 2008 Sep 19;134(6):903-5.

73. Jeger R, Dieterle T. Statins: have we found the Holy Grail? *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13515.
74. Sampson UK, Fazio S, Linton MF. Residual cardiovascular risk despite optimal LDL cholesterol reduction with statins: the evidence, etiology, and therapeutic challenges. *Curr Atheroscler Rep*. 2012 Feb;14(1):1-10.
75. Bikdeli B. C-reactive protein, statins and the risk of vascular events: a better understanding. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011 Dec;25(6):545-9.
76. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ J*. 2010 May;74(5):818-26.
77. Taylor F, Ward K, Moore TH, Burke M, Davey Smith G, Casas JP, et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(1):CD004816.
78. Goedeke L, Fernandez-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Mar;69(6):915-30.
79. Wang W, Le W, Ahuja R, Cho DY, Hwang PH, Upadhyay D. Inhibition of inflammatory mediators: role of statins in airway inflammation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011 Jun;144(6):982-7.
80. Ridker PM. Are statins anti-inflammatory? Issues in the design and conduct of the pravastatin inflammation C-reactive protein evaluation. *Curr Cardiol Rep*. 2000 Jul;2(4):269-73.
81. Spite M, Serhan CN. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res*. 2010 Nov 12;107(10):1170-84.
82. Quist-Paulsen P. Statins and inflammation: an update. *Curr Opin Cardiol*. 2010 Jul;25(4):399-405.
83. Cheifitz R. Lipids, statins and cardiovascular disease. *Climacteric*. 2008 Aug;11(4):347-8; author reply 8-50.
84. Ballantyne CM. Cholesterol, lipids, and statins. *Tex Heart Inst J*. 2005;32(3):378-9.
85. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II18-26.
86. Rammos G, Kondomerkos D. The role of CD4+CD28(null) T-lymphocytes and statins in rheumatoid arthritis and unstable atherosclerotic plaque. *Hellenic J Cardiol*. 2007 May-Jun;48(3):165-74.
87. Nabatov AA, Pollakis G, Linnemann T, Paxton WA, de Baar MP. Statins disrupt CCR5 and RANTES expression levels in CD4(+) T lymphocytes in vitro and preferentially decrease infection of R5 versus X4 HIV-1. *PLoS One*. 2007;2(5):e470.
88. Ghittoni R, Lazzerini PE, Pasini FL, Baldari CT. T lymphocytes as targets of statins: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2007 Mar;6(1):3-16.
89. Gullu S, Emral R, Bastemir M, Parkes AB, Lazarus JH. In vivo and in vitro effects of statins on lymphocytes in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol*. 2005 Jul;153(1):41-8.
90. Schaefer CA, Kuhlmann CR, Gast C, Weiterer S, Li F, Most AK, et al. Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2004 Mar;41(2):67-73.
91. Chen H, Ikeda U, Shimpo M, Shimada K. Direct effects of statins on cells primarily involved in atherosclerosis. *Hypertens Res*. 2000 Mar;23(2):187-92.
92. Hewitt RE, Lissina A, Green AE, Slay ES, Price DA, Sewell AK. The bisphosphonate acute phase response: rapid and copious production of proinflammatory cytokines by peripheral blood gd T cells in response to aminobisphosphonates is inhibited by statins. *Clin Exp Immunol*. 2005 Jan;139(1):101-11.

93. Ng DS. The role of statins in oxidative stress and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005 Apr;5(2):165-75.
94. Yilmaz MI, Baykal Y, Kilic M, Sonmez A, Bulucu F, Aydin A, et al. Effects of statins on oxidative stress. *Biol Trace Elem Res*. 2004 May;98(2):119-27.
95. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol*. 2012 Jan-Feb;6(1):42-9.
96. Parihar A, Parihar MS, Zenebe WJ, Ghafourifar P. Statins lower calcium-induced oxidative stress in isolated mitochondria. *Hum Exp Toxicol*. 2012 Apr;31(4):355-63.
97. Botelho PB, Fioratti CO, Abdalla DS, Bertolami MC, Castro IA. Classification of individuals with dyslipidaemia controlled by statins according to plasma biomarkers of oxidative stress using cluster analysis. *Br J Nutr*. 2010 Jan;103(2):256-65.
98. Dellioux S, Steinberg JG, Bechis G, Paganelli F, Oliver C, Lesavre N, et al. Statins alter oxidant-antioxidant status and lower exercise-induced oxidative stress. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2007 Apr;45(4):244-52.
99. Barrios-Gonzalez J, Miranda RU. Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Jan;85(4):869-83.
100. Nair PK, Mulukutla SR, Marroquin OC. Stents and statins: history, clinical outcomes and mechanisms. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010 Sep;8(9):1283-95.
101. Igel M, Sudhop T, von Bergmann K. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol*. 2002 Aug;42(8):835-45.
102. Chalasani N. Statins and hepatotoxicity: focus on patients with fatty liver. *Hepatology*. 2005 Apr;41(4):690-5.
103. Teschke R. Hepatotoxicity associated with statins. *Ann Hepatol*. 2012 May-Jun;11(3):418-20.
104. Bjornsson E, Jacobsen EI, Kalaitzakis E. Hepatotoxicity associated with statins: reports of idiosyncratic liver injury post-marketing. *J Hepatol*. 2012 Feb;56(2):374-80.
105. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
106. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
107. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983 Jul 15;132(2):345-52.
108. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993 Oct;15(4):353-63.
109. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol*. 2000;99:15-24.
110. Gibbs IS, Tuckerman MM. Assay of sodium nitrite. *J Pharm Sci*. 1965 Jun;54(6):907-8.
111. Burburan SM, Xisto DG, Ferreira HC, Riva Ddos R, Carvalho GM, Zin WA, et al. Lung mechanics and histology during sevoflurane anesthesia in a model of chronic allergic asthma. *Anesth Analg*. 2007 Mar;104(3):631-7.
112. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Dec;19(12):2894-900.
113. Kowalski J, Barylski M, Banach M, Grycewicz J, Irzmanski R, Pawlicki L. Neutrophil superoxide anion generation during atorvastatin and fluvastatin therapy used in

- coronary heart disease primary prevention. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Oct;48(4):143-7.
114. Walter T, Suselbeck T, Borggreffe M, Swoboda S, Hoffmeister HM, Dempfle CE. Effect of atorvastatin on cellular adhesion molecules on leukocytes in patients with normocholesterolemic coronary artery disease. *In Vivo.* 2010 Mar-Apr;24(2):189-93.
 115. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotans MC, Benderitter M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res.* 2005 May;163(5):479-87.
 116. Egashira K, Ni W, Inoue S, Kataoka C, Kitamoto S, Koyanagi M, et al. Pravastatin attenuates cardiovascular inflammatory and proliferative changes in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis by its cholesterol-lowering independent actions. *Hypertens Res.* 2000 Jul;23(4):353-8.
 117. Turner NA, Midgley L, O'Regan DJ, Porter KE. Comparison of the efficacies of five different statins on inhibition of human saphenous vein smooth muscle cell proliferation and invasion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007 Oct;50(4):458-61.
 118. Iwata A, Shirai R, Ishii H, Kushima H, Otani S, Hashinaga K, et al. Inhibitory effect of statins on inflammatory cytokine production from human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2012 May;168(2):234-40.
 119. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, et al. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis.* 1999 Dec;147(2):253-61.
 120. Yao HW, Mao LG, Zhu JP. Protective effects of pravastatin in murine lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 Sep;33(9):793-7.
 121. Hilgendorff A, Muth H, Parviz B, Staubitz A, Haberbosch W, Tillmanns H, et al. Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003 Sep;41(9):397-401.
 122. Passi S, Stancato A, Aleo E, Dmitrieva A, Littarru GP. Statins lower plasma and lymphocyte ubiquinol/ubiquinone without affecting other antioxidants and PUFA. *Biofactors.* 2003;18(1-4):113-24.
 123. Uchida T. Acute lung injury and alveolar epithelial function. *J Anesth.* 2011 Feb;25(1):152-4.
 124. Senn O, Clarenbach CF, Fischler M, Thalmann R, Brunner-La Rocca H, Egger P, et al. Do changes in lung function predict high-altitude pulmonary edema at an early stage? *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Sep;38(9):1565-70.
 125. Siempos, II, Maniatis NA, Kopterides P, Magkou C, Glynos C, Roussos C, et al. Pretreatment with atorvastatin attenuates lung injury caused by high-stretch mechanical ventilation in an isolated rabbit lung model. *Crit Care Med.* 2010 May;38(5):1321-8.

Original Article

Low tidal volume mechanical ventilation and oxidative stress in healthy mouse lungs*, **

Ventilação mecânica com baixo volume corrente e estresse oxidativo em pulmões saudáveis de camundongos

Karla Maria Pereira Pires, Adriana Correa Melo, Manuella Lanzetti, Natália Vasconcelos Casquillo, Walter Araújo Zin, Luís Cristóvão Porto, Samuel Santos Valença

Abstract

Objective: Mechanical ventilation (MV) itself can directly contribute to lung injury. Therefore, the aim of the present study was to investigate early biomarkers concerning oxidant/antioxidant balance, oxidative stress, and inflammation caused by short-term MV in healthy mouse lungs. **Methods:** Twenty male C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: MV, submitted to low tidal volume (V_T , 6 mL/kg) MV for 30 min; and spontaneous respiration (SR), used as controls. Lung homogenate samples were tested regarding the activity of various antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and TNF- α expression. **Results:** In comparison with the SR group, the MV group showed a significant decrease in the activity of superoxide dismutase ($\approx 35\%$; $p < 0.05$), together with an increase in the activity of catalase (40%; $p < 0.01$), glutathione peroxidase (500%; $p < 0.001$), and myeloperoxidase (260%; $p < 0.001$), as well as a reduction in the glutathione/oxidized glutathione ratio ($\approx 50\%$; $p < 0.05$) and an increase in TNF- α expression in the MV group. Oxidative damage, assessed by lipid peroxidation, was also greater in the MV group (45%; $p < 0.05$). **Conclusions:** Our results show that short-term low V_T MV can directly contribute to lung injury, generating oxidative stress and inflammation in healthy mouse lungs.

Keywords: Ventilator-induced lung injury; Respiration, artificial; Oxidative stress; Inflammation; Mice.

Resumo

Objetivo: A ventilação mecânica (VM) por si própria pode contribuir diretamente para a lesão pulmonar. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar biomarcadores precoces relacionados ao equilíbrio oxidantes/antioxidantes, estresse oxidativo e inflamação causados por VM de curta duração em pulmões de camundongos saudáveis. **Métodos:** Vinte camundongos C57BL/6 machos foram randomicamente divididos em dois grupos: VM, submetidos a VM com baixo volume corrente (V_T , 6 mL/kg) por 30 min; e respiração espontânea (RE), utilizados como controles. Amostras de homogeneizados de pulmão foram testadas quanto à atividade de enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e expressão de TNF- α . **Resultados:** Comparados ao grupo RE, houve uma redução significativa na atividade de superóxido dismutase ($\approx 35\%$; $p < 0,05$) e aumento da atividade de catalase (40%; $p < 0,01$), glutatona peroxidase (500%; $p < 0,001$) e mieloperoxidase (260%; $p < 0,001$), ao passo que a razão glutatona reduzida/glutaciona oxidada foi menor ($\approx 50\%$; $p < 0,05$), e houve um aumento na expressão de TNF- α no grupo VM. O dano oxidativo, analisado como peroxidação lipídica, também aumentou no grupo VM (45%; $p < 0.05$). **Conclusões:** Nossos resultados demonstraram que VM de curta duração com baixa V_T pode contribuir diretamente para a lesão pulmonar, gerando estresse oxidativo e inflamação em pulmões de camundongos saudáveis.

Descritores: Lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica; Respiração artificial; Estresse oxidativo; Inflamação; Camundongos.

* Study carried out under the auspices of the Graduate Program in Experimental and Human Biology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, Rio de Janeiro State University); Laboratory of Respiration Physiology at the Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Federal University of Rio de Janeiro); and Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Federal University of Rio de Janeiro), Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to: Samuel Santos Valença. LABCOM/ICB/CCS/UFRJ. Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco P, Sala 14, Ilha do Fundão, CBP 21.941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Tel. 55 21 2562-6460. Fax: 55 21 2562-6734. E-mail: samuelv@ufrj.br

Financial support: This study received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Rio de Janeiro Research Foundation), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Office for the Advancement of Higher Education), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development).

Submitted: 24 May 2011. Accepted, after review: 1 December 2011.

**A versão completa em português deste artigo está disponível em www.jornaldepneumologia.com.br



Contents lists available at ScienceDirect

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ypupt

L-NAME and L-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice

Samuel Santos Valença^{a,*}, Carlos Romualdo Rueff-Barroso^{b,1,2}, Wagner Alves Pimenta^b, Adriana Correa Melo^{a,b}, Renata Tiscoski Nesi^{a,b}, Marco Aurélio Santos Silva^b, Luís Cristóvão Porto^b^a Institute of Biomedical Science, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil^b Laboratory of Tissue Repair, Department of Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 December 2010
Received in revised form
25 April 2011
Accepted 14 May 2011

Keywords:
Nitric oxide
Cigarette smoke
Inflammation
Oxidative stress
Mouse

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) represents one of the most important intra- and extracellular mediators and takes part in both biologic and pathologic processes. This study aimed to verify the treatment with an NO inhibitor and an NO substrate in pulmonary emphysema induced by cigarette smoke (CS) in a murine model. We compared N-acetylcysteine (NAC), a precursor of glutathione, to G-nitro-L-Arginine-Methyl Ester or L-NAME (LN), which is an NO inhibitor, and to L-arginine (LA), which is a substrate for NO formation. Mice were divided into several groups: control, CS, CS + LN, CS + LA, and CS + NAC. Control and CS groups were treated daily with a vehicle, while CS + LN, CS + LA, and CS + NAC groups were treated daily with LN (60 mg/kg), LA (120 mg/kg) and NAC (200 mg/kg), respectively. The bronchoalveolar lavage was analyzed and the lungs were removed for histological and biochemical analysis. CS increases neutrophil number. Neutrophil number was lowest in CS + LN, followed by CS + LA. The lungs of CS + LN, CS + LA and CS + NAC mice were protected compared to the lungs of CS mice, but not equal to the quality of lungs in control mice. The CS group also exhibited increased oxidative stress, which was also present in the CS + LN group and to a lesser extent in the CS + LA group. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and 2 increased in the CS + LN group and to a lesser extent in the CS + LA group relative to the control group. These results suggest that LN and LA treatment protected the mouse lung from CS. However, NAC treatment was more than LN and LA. We suggest that the protection conferred by LN treatment requires a balance between proteases and antiproteases, and that protection conferred by LA treatment involves the balance between oxidants and antioxidants.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tobacco is thought to have been cultivated since 5000–3000 BC, and its use originated from the American continents involving ancient people who lived mainly in the Andes around Peru and Ecuador [1]. In the beginning, tobacco was consumed in many forms: it was sniffed, smoked, chewed, eaten and drunk. It was

blown into warriors' faces before battle and over women before sex. It was used medicinally and in religious ceremonies as an offering to the gods [2]. When Christopher Columbus arrived in Spain, prior to his first journey in North America in 1492, he brought tobacco to the Old World. However, the Europeans gained more experience with tobacco in 1500 when Pedro Alvarez Cabral, a Portuguese explorer, reached what is Brazil today. In Brazil, the native inhabitants believed that tobacco was a holy herb [3]. Smoking tobacco spread quickly into Europe. Afterwards, tobacco became popular as a cigarette during the First World War. Later, it developed into a sign of social status. Nowadays, cigarette smoke represents the most important risk factor for respiratory diseases, and it is the first risk factor to contribute to chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), specifically emphysema and asthma [4].

The COPD is characterized by the deterioration of small airways and obstruction associated with cellular inflammation and structural remodeling [5]. The prediction of the World Health Organization [6] is that COPD will become the third leading cause of

* Corresponding author. Laboratório Compartilhado, ICB/CCS/UFRJ, Av. Prof. Carlos Chagas Filho 373, Bloco F/sala 14, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, R.J. CEP: 21941-902, Brazil. Tel./fax: +55 21 25 62 64 60.

E-mail addresses: samueltv@ufrj.br (S.S. Valença), carlosrueff@yahoo.com.br (C.R. Rueff-Barroso), wagpipimenta@yahoo.com.br (W.A. Pimenta), adriana@fisickfisioterapia.com.br (A.C. Melo), retiscoski@hotmail.com (R.T. Nesi), marcoauréliosantos@hotmail.com (M.A.S. Silva), lporto@uerj.br (L.C. Porto).

¹ Present address: Laboratory of Experimental Morphology, Department of Morphology, Fluminense Federal University, Brazil.

² Contributed equally to this study.