

DANIEL AUGUSTO GASPARIN BUENO MENDES

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO FENÔMENO DE
HIPERPROLIFERAÇÃO DA EPIDERME EM CAMUNDONGOS

CURITIBA

2009

DANIEL AUGUSTO GASPARIN BUENO MENDES

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO FENÔMENO DE
HIPERPROLIFERAÇÃO DA EPIDERME EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia

Orientadora:

Prof^a Dr^a Daniela de Almeida Cabrini

Co-orientador:


Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA


2009

1
2 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

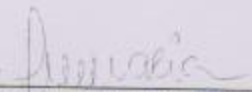
3 Ao vigésimo oitavo dia do mês de agosto do ano de dois mil e nove, às quatorze
4 horas, no Anfiteatro nº 07 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do
5 Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria do pós-
6 graduando em Farmacologia **DANIEL A. G. B. MENDES** intitulada: "PARTICIPAÇÃO
7 DO ÓXIDO NÍTRICO NO FENÔMENO DE HIPERPROLIFERAÇÃO DA EPIDERME
8 EM CAMUNDONGOS", sob orientação da Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini e
9 composta pelos professores: Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini (Presidente -
10 Farmacologia - UFPR); Prof. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas - UEPG); Profª
11 Drª Maria Fernanda P. Werner (Fisiologia - UFSC). A Banca Examinadora iniciou os
12 trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
13 sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e
14 tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão
15 Examinadora emitiu o seguinte parecer: Aprovado. De acordo com o
16 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi
17 aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão
18 conferidas por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada
19 a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos
20 demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 28 de agosto de 2009.

21
22
23


Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas - UEPG)



Profª Drª Maria Fernanda de Paula Werner (Fisiologia - UFSC)

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO FENÔMENO DE HIPERPROLIFERAÇÃO DA EPIDERME EM CAMUNDONGOS", de autoria do pós-graduando: **DANIEL A. G. B. MENDES**, sob orientação da Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini e composta pelos professores: Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas - UEPG); Profª Drª Maria Fernanda P. Werner (Fisiologia - UFSC). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi aprovado. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Em Curitiba, 28 de agosto de 2009.



Profª Drª Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof. Daniel Fernandes (Ciências Farmacêuticas - UEPG)



Profª Drª Maria Fernanda de Paula Werner (Fisiologia - UFSC)

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver..."*

Martin Luther King

Dedico a minha mãe, Consuelo
Obrigado por estar sempre ao meu lado;
Seu amor e carinho são sem dúvida;
peças fundamentais no meu crescimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Daniela de Almeida Cabrini e Michel Fleith Otuki pelos ensinamentos, dedicação e principalmente confiança para elaboração deste trabalho. O caminho trilhado não seria possível sem os conhecimentos e competência prestados por vocês;

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy pela colaboração com sugestões e drogas disponibilizada para o desenvolvimento deste estudo;

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Daniel Fernandes e a Dra. Maria Fernanda de Paula Werner pela leitura e colaboração para a finalização deste trabalho;

Aos familiares, Carlos Alberto, Léa, Rodrigo, Rose Mary, pelo apoio, compreensão e carinho;

À namorada Deborah, pela compreensão, apoio e amor dedicado em todos os momentos durante estes anos;

Aos meus colegas de laboratório e departamento que contribuíram de alguma forma durante esta trajetória. Em especial aos amigos Arthur, Cíntia, Evelise e Shirley, que foram essenciais no dia a dia não apenas dentro do laboratório, mas principalmente fora dele;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e Biotério desta Universidade;

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PELE	1
1.2 ÓXIDO NÍTRICO NA PELE	7
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. ANIMAIS	17
3.2. PROTOCOLO ANIMAL	17
3.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EPIDERME	18
3.4. MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR	19
3.5. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO	20
3.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG	21
3.7. DROGAS E REAGENTES	22
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS	24
4.1. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON	24
4.2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EPIDERME	30
4.3. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	34
4.4. AVALIAÇÃO DO ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO	38
4.5. AVALIAÇÃO DO ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _i :	Concentração de cálcio intracelular
7-NI:	7-Nitroindazole
AD:	Dermatite atópica
AG:	Aminoguanidina
AP-1:	Proteína ativadora-1
BH ₄ :	Tetraidrobiopterina
BSA:	Albumina sérica bovina
COX-2:	Ciclooxigenase 2
CREB:	Elemento de ligação em resposta a AMPc
EGF:	Fator de crescimento epidérmico
eNOS:	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK:	Quinase regulada por sinal extracelular
GMPc:	Monofosfato guanosina cíclico
HTBA:	Hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ :	Interferon-gama
IGF:	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1:	Interleucina 1
IL-8:	Interleucina-8
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzida
KGF:	Fator de crescimento de queratinócitos
L-NAME:	N ^G -nitro-L-arginina-metil ester.HCl
LPS:	Lipopolissacarídeo
LTB ₄ :	Leucotrieno B ₄
MAPK:	Proteína quinase ativada por mitógeno
MPO:	Mieloperoxidase
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAG:	N-acetil- β -D-glucosaminidase
NF- κ B:	Fator nuclear-kappa B
nNOS:	Óxido nítrico sintase neuronal
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Óxido nítrico sintase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONT.)

PBS:	Tampão fosfato
PCNA:	Antígeno nuclear de proliferação nuclear
PDTC:	Pirrolidina ditiocarbamato
PKA:	Proteína quinase A
PKC:	Proteína quinase C
SNP:	Nitroprussiato de sódio
TGF:	Fator de crescimento transformador
TMB:	Tetrametilbenzidina.HCl
TNF- α :	Fator de necrose tumoral-alfa
TPA:	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UV:	Ultravioleta
VEGF:	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação esquemática do corte transversal da pele.....	2
Figura 02: Representação esquemática do corte transversal da epiderme	3
Figura 03: Representação esquemática da pele, indicando as isoformas expressas por cada tipo celular da pele	10
Figura 04: Efeito de inibidores (L-NAME e AG) de óxido nítrico sobre o edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton	25
Figura 05: Efeito do inibidor (7-NI) e doador (SNP) de óxido nítrico sobre o edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton	27
Figura 06: Efeito do doador e inibidores de óxido nítrico sobre o peso das orelhas dos animais induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton	28
Figura 07: Fotos representativas de cortes histológicos das orelhas tratadas com doador e inibidores de óxido nítrico.....	31
Figura 08: Avaliação histológica da espessura da epiderme nas orelhas tratadas com doador e inibidores de óxido nítrico.....	32
Figura 09: Fotos representativas de cortes com marcação da proteína PCNA por imunohistoquímica das orelhas tratadas com doador e inibidores de óxido nítrico	35
Figura 10: Avaliação da marcação da proteína PCNA por imunohistoquímica nas orelhas tratadas com doador e inibidores de óxido nítrico	36
Figura 11: Efeito do doador e inibidores de óxido nítrico sobre a atividade enzimática da MPO.....	37
Figura 12: Efeito do doador e inibidores de óxido nítrico sobre a atividade enzimática da NAG	39

RESUMO

Muitos autores relataram uma significativa participação do óxido nítrico (NO) no processo de proliferação dos queratinócitos, porém com muitas divergências. Para determinar o envolvimento do NO no processo de hiperproliferação da epiderme *in vivo*, foram usados: um inibidor não seletivo (L-NAME) de óxido nítrico sintase (NOS); inibidores seletivos para iNOS e nNOS (AG e 7-NI, respectivamente); e um doador de NO (SNP). Os tratamentos foram aplicados topicamente, duas vezes por dia, na orelha de camundongos tratados pela múltipla aplicação de óleo de cróton. A aplicação do L-NAME foi capaz de diminuir o edema a partir do 1º dia de tratamento e SNP foi capaz de aumentar a formação do edema de orelha a partir do 3º dia. Os resultados obtidos mostram que os tratamentos com AG e 7-NI não foram capazes de alterar a formação do edema. Ao final do tratamento, houve uma redução no peso das orelhas nos grupos que receberam L-NAME ($16,9 \pm 4,8\%$), 7-NI ($18,3 \pm 9,1\%$) e dexametasona ($43,8 \pm 2,0\%$), enquanto a AG e SNP apresentaram aumento de peso, $24,9 \pm 5,7$ e $22,0 \pm 9,2\%$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($24,3 \pm 1,4$ mg). A análise histológica mostrou que todos os inibidores foram capazes de impedir o aumento na espessura da epiderme em $28,2 \pm 5,3\%$ (L-NAME), $20,7 \pm 5,3\%$ (AG) e $20,5 \pm 3,4\%$ (7-NI), assim como a dexametasona ($53,5 \pm 3,5\%$). Já o SNP contribuiu para ampliar a espessura da epiderme em $35,6 \pm 5,7\%$. Resultados semelhantes foram observados na marcação da proteína PCNA por imunohistoquímica, onde houve uma redução no número de células em proliferação nos tratamentos com L-NAME ($57,3 \pm 3,9$ células/campo), AG ($73,3 \pm 2,7$ células/campo) e dexametasona ($37,0 \pm 1,8$ células/campo). No entanto, o tratamento com SNP ($100,8 \pm 6,7$ células/campo) promoveu uma maior proliferação dos queratinócitos da epiderme. O tratamento com 7-NI não mostrou nenhuma alteração no número de queratinócitos em proliferação quando comparado ao grupo controle ($87,1 \pm 6,8$ células/campo). O tratamento com AG aumentou a atividade das enzimas Mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glucosaminidase, $52,8 \pm 23,9\%$ e $16,35 \pm 6,3\%$ respectivamente, indicando aumento na migração de leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares em comparação ao grupo controle. A aplicação do 7-NI reduziu apenas a migração de células mononucleares em $14,6 \pm 6,1\%$, enquanto o tratamento com SNP reforçou a migração de polimorfonucleares em $74,4 \pm 47,9\%$. Portanto, baseado nos resultados encontrados, sugerimos que o NO produzido principalmente pela isoforma iNOS, contando também com a contribuição da isoforma nNOS, está envolvido no controle da hiperproliferação dos queratinócitos da epiderme na pele de camundongos. Além disso, no modelo animal de inflamação crônica cutânea por óleo de cróton, o NO está envolvido na exsudação e migração de leucócitos, com a provável participação de todas as três isoformas da enzima.

ABSTRACT

Many authors have reported a significant involvement of nitric oxide (NO) in keratinocyte proliferation, but the available information present many discrepancies. In order to determine the involvement of NO in the epidermis hyperproliferation *in vivo*, the following substances were used: a non-selective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) (L-NAME); two NOS selective inhibitors (AG and 7-NI) for induced (iNOS) and neuronal (nNOS) isoformes, respectively; and a NO donor (sodium nitroprusside, SNP). Drugs were topically applied twice a day in the ear of mice treated by multiple applications of croton oil. L-NAME treatment was able to decrease the edema formation from the 1st day of treatment while the SNP application increased the edema development from the 3rd day. Our results also show that treatments with AG and 7-NI were not able to alter the edema formation. In the end of treatment, a reduction in the weight of ears that received L-NAME ($16.9 \pm 4.8\%$), 7-NI ($18.3 \pm 9.1\%$) or dexamethasone ($43.8 \pm 2.0\%$), while AG and SNP treatment increase ear weight in 24.9 ± 5.7 and $22.0 \pm 9.2\%$, respectively, when compared to the control group. Histological analysis revealed that application of all inhibitors were able to prevent the increase in the thickness of epidermis in $28.2 \pm 5.3\%$ (L-NAME), $20.7 \pm 5.3\%$ (AG) and $20.5 \pm 3.4\%$ (7-NI), and $53.5 \pm 3.5\%$ (dexamethasone). On the other hand the SNP contributed to enlarge the thickness of epidermis in $35.6 \pm 5.7\%$. Similar results were observed in the PCNA immunohistochemistry analysis, where there was a reduction in the number of proliferating cells after treatments with L-NAME (57.3 ± 3.9 cells/field), AG (73.3 ± 2.7 cells/field) and dexamethasone (37.0 ± 1.8 cells/field). However, SNP application (100.8 ± 6.7 cells/field) promoted a greater keratinocyte proliferation in the epidermis. 7-NI treatment did not alter the number of proliferating keratinocyte when compared to the control group (87.1 ± 6.8 cells/field). AG treatment also increased the activity of the Myeloperoxidase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase in $52.8 \pm 23.9\%$ and $16.35 \pm 6.3\%$ respectively, indicating an increase in the polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells migration compared to the control group. Application of 7-NI reduced just the mononuclear cells migration in $14.6 \pm 6.1\%$, while treatment with SNP enhanced polymorphonuclear cells migration in $74.4 \pm 47.9\%$. Therefore, based on these results, the results suggest that NO produced mainly by iNOS isoform is involved in the controlling of epidermis keratinocytes hyperproliferation in the skin of mice, with the contribution of nNOS isoform. Furthermore, in the animal model of skin chronic inflammation by croton oil application, NO is involved in the exudation and leukocyte migration, with the participation of all three isozymes.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano representando 15% do peso corpóreo. A pele compõe-se, essencialmente, de três grandes camadas: uma camada superior – a epiderme; uma camada intermediária – a derme ou cório; e uma camada profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo (SAMPAIO *et al.*, 2000). E por ser a primeira barreira com o meio externo é constantemente sujeita a lesões e invasão de patógenos que podem gerar diversas desordens inflamatórias. Desta forma, possui um papel importante na manutenção e desenvolvimento da defesa contra estes invasores ou lesões, desencadeando um processo inflamatório que é produzido e mantido pela interação de vários tipos celulares residentes como: terminações nervosas, queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais e macrófagos, além de células que migram para o tecido inflamado como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (Figura 01). Assim, vários mediadores pró-inflamatórios solúveis são liberados como neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, etc.), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, etc.), monoaminas (histamina, serotonina, etc.) e citocinas (interleucinas, interferons, etc.). Estes mediadores por sua vez, através de seus receptores, produzem vários segundos mensageiros que ativam diversas proteínas quinases como a PKC, PKA e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Estas proteínas podem ativar fatores nucleares, como o fator nuclear-kappa B (NF-κB) e a proteína ativadora -1 (AP-1), responsáveis pela

transcrição de diversas proteínas (citocinas, enzimas, etc.), modulando, mantendo e amplificando a resposta inflamatória (BUCKLE e HEDGECOCK, 1997; PUIGNERO e QUERALT, 1997; BHAGWAT *et al.*, 1999). A falha destes mecanismos pode fazer com que este processo, inicialmente agudo, desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver processos inflamatórios crônicos (WILLIAMS e KUPPER, 1996; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

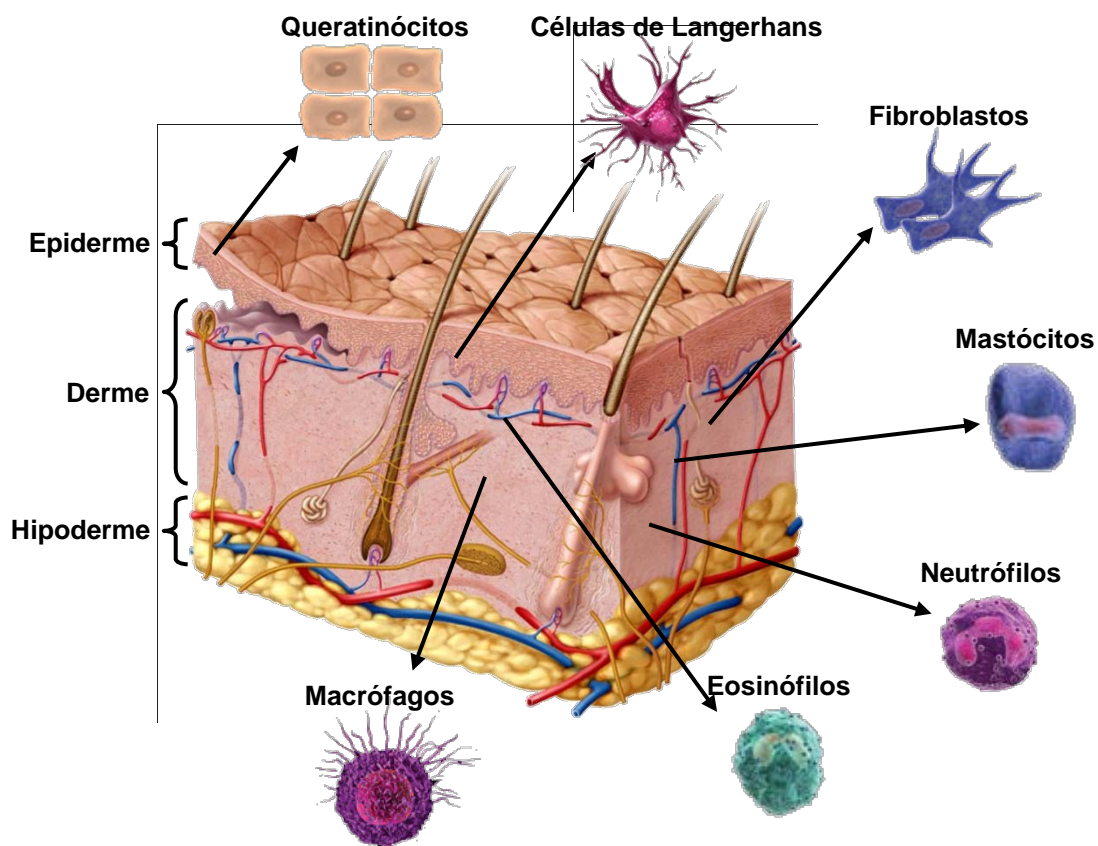


Figura 01: Representação esquemática do corte transversal da pele, demonstrando as três camadas: epiderme, derme e hipoderme e os principais tipos celulares presentes em cada camada.

A camada superior da pele, a epiderme (Figura 02), é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso (SAMPAIO *et al.*, 2000; CANDI *et al.*, 2005). Subdividido em quatro camadas, cada uma com funções distintas (NORRIS, 2004). A camada ou estrato córneo atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água. No estrato

granuloso, inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos. No estrato espinhoso, os queratinócitos presentes são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização), e por fim, a camada ou estrato basal, que é a camada mais profunda e responsável pela proliferação celular, sendo resistente ao processo apoptótico. Sendo assim, a epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13 % de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel (FREINKEL e WOODLEY, 2001; KOSTER e ROOP, 2004).

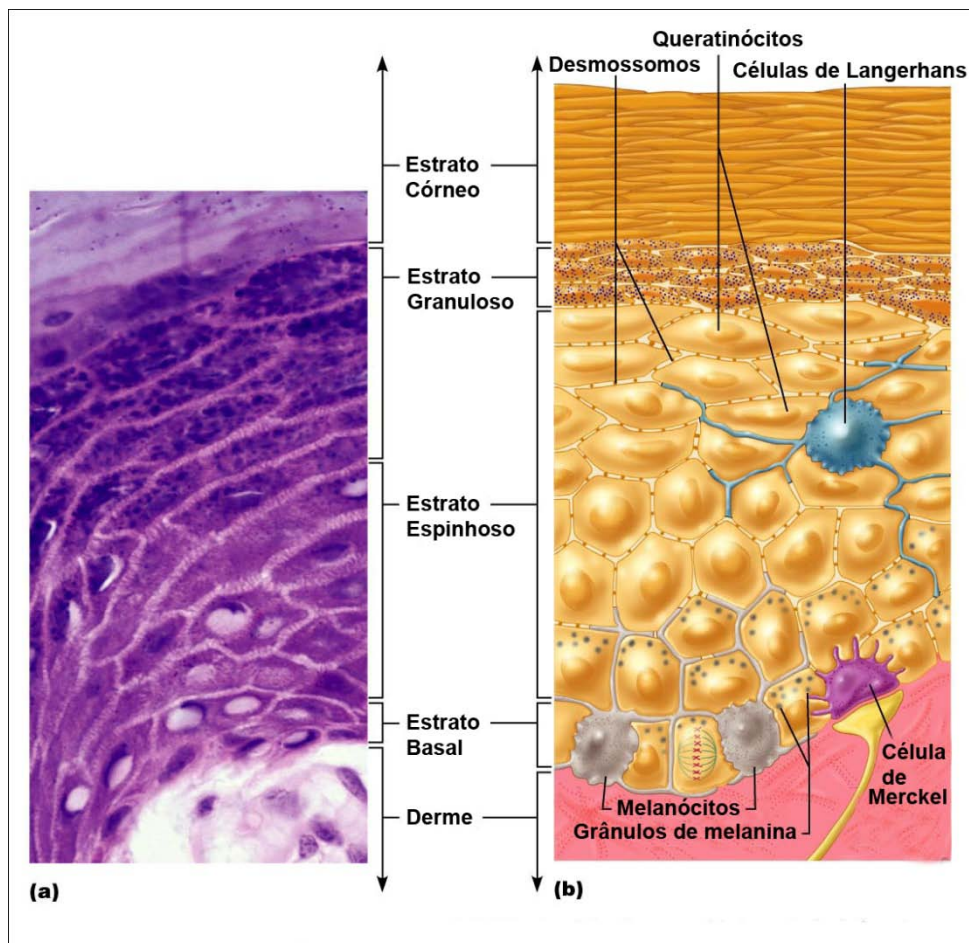


Figura 02: (a) Corte histológico transversal da região da epiderme e (b) representação esquemática do corte transversal da epiderme, demonstrando as quatro camadas: Estrato Córneo, Estrato Granuloso, Estrato Espinhoso e Estrato Basal.

A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação celular e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. A epiderme tem a capacidade de auto-renovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular ativamente mitótica na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, quando se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção a superfície (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; CANDI *et al.*, 2005).

Na fase de proliferação celular da camada basal, durante o desenvolvimento do processo inflamatório, os queratinócitos têm um papel fundamental. Ocorre uma notável mudança na morfologia e função destas células, que migram até a camada superficial da região lesionada, liberando inúmeras proteínas e enzimas que facilitam a migração e outras funções celulares, reconstituindo a epiderme lesada e a membrana basal. Por último, ocorre a formação do tecido de granulação e reconstituição da matriz dérmica, fibroplasia pelos fibroblastos e angiogênese pelas células endoteliais. Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais interagem com células ao redor, especificamente através de integrinas para a cicatrização da lesão (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

São encontrados, ainda na epiderme, os melanócitos que são as células responsáveis pela produção de pigmentos, e as células de Langerhans que são células apresentadoras de antígenos (DENNING, 2004). Próximo a essas células encontram-se também alguns linfócitos T, que são geralmente células de memória (SPELLBERG, 2000). A epiderme não possui vasos sanguíneos, entretanto, está intimamente apoiada à derme através de uma lâmina basal, sendo, portanto, a

derme responsável pelo suporte sanguíneo da epiderme. Além das células residentes da epiderme, outras células migram para essa camada em resposta aos mais variados estímulos nas quais se incluem: os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, sendo esses elementos da resposta de defesa inata ou adquirida (NORRIS, 2004; RANG *et al.*, 2006).

A camada intermediária, a derme, consiste num tecido conectivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tênsil e resistência mecânica. (HAAKE *et al.*, 2001). Possui uma camada mais superficial e frouxa, a camada papilar e uma camada mais profunda e mais densa, a reticular (GARTNER e HIATT, 1999). Essas camadas possuem matrizes extracelulares diferentes, na derme papilar as fibras de colágeno são pouco organizadas e finas, e consistem principalmente de colágeno dos tipos III, existem ainda fibras elásticas que junto às fibras de colágeno se organizam de forma bastante frouxa. Já na derme reticular a matriz é mais densa, com fibras mais grossas e melhor organizadas, são encontradas principalmente fibras de colágeno do tipo I, e as fibras elásticas são mais espessas e se agrupam com o colágeno em redes firmemente entrelaçadas (GARTNER e HIATT, 1999; SORRELL e CAPLAN, 2004). Sendo assim, a constituição da derme envolve polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex., corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos linfáticos e sanguíneos, que permitem que ocorra a infiltração de células migratórias como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, entre outras, as quais são importantes no processo de resposta de defesa inata ou imune

e de cicatrização. (RYAN, 2004). Os fibroblastos sintetizam diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz celular como, por exemplo, o colágeno e a elastina (SAMPAIO *et al.*, 2000; HAAKE *et al.*, 2001). Durante um processo inflamatório ou de cicatrização ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 α (IL-1 α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda prontamente e efetivamente frente a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta e extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea. E nesse contexto, a pele demonstra ser muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas sim, indubitavelmente, também uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS e KUPPER, 1996; HAAKE *et al.*, 2001).

A camada mais profunda, a hipoderme, possui espessura variável, composta exclusivamente por tecido adiposo. Relaciona-se em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo-se a junção dermo-hipodérmica. Funcionalmente, a hipoderme além de depósito de reserva nutritiva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (SAMPAIO *et al.*, 2000).

Alguns processos anatomopatológicos que podem ocorrer na pele são: degenerações, alterações metabólicas, proliferações, malformações, disfunções e

inflamações. As degenerações são características de determinadas afecções, tais como a degeneração balonizante própria das viroses, a degeneração fibrinoide própria das colagenases e a degeneração granular, também chamada de hiperqueratose epidermolítica, que ocorre em algumas doenças congênitas nas quais há alterações da queratinização. Como a pele está estreitamente ligada aos demais sistemas orgânicos, sofre alterações decorrentes de anormalidades do metabolismo e, como resposta reflexa, alterações cutâneas extensas por sua vez, são capazes de produzir alterações metabólicas (SAMPAIO *et al.*, 2000).

1.2 ÓXIDO NÍTRICO NA PELE

O óxido nítrico (NO) tem sido relacionado a numerosas funções homeostáticas, como melanogênese, angiogênese, cicatrização, síntese de colágeno, e vasodilatação (ROMERO-GRAILLET *et al.*, 1997; FRANK *et al.*, 2000; BOISSEL *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2006). Também está envolvido em condições patológicas, tais como processos hiperproliferativos de células, doenças de pele mediadas por resposta imune, e outros processos inflamatórios como queimadura solar, psoríase, necrose epidérmica tóxica e lúpus cutâneo eritematoso (LERNER *et al.*, 2000; BRUCH-GERHARZ *et al.*, 2003; PAUNEL *et al.*, 2005).

A biossíntese do NO é mediada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), das quais as três principais isoformas identificadas são: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, também conhecida como NOS1), isolada a partir de tecido neuronal, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3) encontrada predominante no endotélio e a isoforma induzida óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2),

(MCDONALD e MURAD, 1996; MICHEL e FERON, 1997; ALDERTON *et al.*, 2001). Estas isoenzimas agem como dioxigenases utilizando oxigênio molecular e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para transformar a L-arginina em L-citrulina e NO. Para uma produção adequada de NO todas as enzimas NOS dependem de um cofator essencial, o tetraidrobiopterina (BH₄) e uma vez que esse cofator esteja ausente as NOS produzem superóxido no lugar de NO (GUZIK *et al.*, 2000; ALP *et al.*, 2003).

As atividades das isoformas conhecidas como constitutivas NOS1 e NOS3 são controladas pelos níveis intracelulares de cálcio. Por exemplo, NOS1 em neurônios centrais é ativada pela ligação do glutamato em receptores NMDA com posterior aumento da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), devido à abertura de canais voltagem dependentes, enquanto que NOS3 é ativada por estresse das paredes dos vasos sanguíneos ou estimulação de diversos receptores presentes no endotélio como, receptores muscarínico, purinérgico, das cininas, da substância P ou de trombina. Estes estímulos desencadeiam um aumento da $[Ca^{2+}]_i$, havendo extensa liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Ainda, o ionóforo de cálcio (por exemplo, A23187) e policátions (por exemplo, poli-L-lisina) provocam um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüente ativação da NOS3 (SCHMIDT *et al.*, 1992).

Em contraste com as isoformas constitutivas de NOS, a NOS2 não requer um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ para iniciar a sua atividade. Em macrófagos, monócitos e outras células a indução da NOS2 e a presença do substrato L-arginina são suficientes para iniciar a produção de NO. Esta indução da NOS2 pode ser iniciada por citocinas inflamatórias tais como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 (HEBA *et al.*, 2001) ou polissacarídeos bacterianos (NAKAI *et al.*, 2006). Em cultura de queratinócitos é observado que a expressão da

NOS2 pode ser induzida pela combinação de IFN- γ /TNF- α , lipopolissacárideo (LPS)/IFN- γ , IFN- γ /interleucina-8 (IL-8) ou TNF- α /IL-1 β (HECK *et al.*, 1992; BRUCHGERHARZ *et al.*, 1996; SIRSJO *et al.*, 1996). É possível que o coquetel de citocinas ao qual as células são expostas possa determinar a taxa e magnitude da produção NO (JACOBS e IGNARRO, 2001). No entanto, Delatorre e colaboradores (1999) descreveram que o processo inflamatório é auto-regulado, e isto se deve em parte a expressão da NOS2 e produção do NO, que por sua vez, causa S-nitrosilação na subunidade p50 do NF- κ B, impedindo a ativação deste fator de transcrição, e conseqüente expressão de mediadores.

Na pele, células como queratinócitos, fibroblastos, melanócitos e células endoteliais expressam NOS e parecem ser capazes de liberar NO (CALSGRIERSON e ORMEROD, 2004). No que diz respeito ao queratinócito humano normal, além de um contínuo e baixo nível de NO atribuído às isoformas constitutivas, também podem ser produzidos níveis mais altos de NO através da expressão da isoforma induzível (NOS2) em resposta às citocinas pró-inflamatórias, LPS e radiação ultravioleta (UV) (CHANG *et al.*, 2003; BOISSEL *et al.*, 2004; PAUNEL *et al.*, 2005; NAKAI *et al.*, 2006).

A isoforma NOS2 produz grande quantidade de NO de uma forma sustentada chegando a níveis tóxicos, enquanto que as isoformas constitutivas produzem NO em pequena quantidade e por poucos segundos sendo suas atividades de ação direta e curta. Sendo que existem vários mecanismos intracelulares através dos quais o NO pode agir como um mediador pró-inflamatório (SALVEMINI *et al.*, 2003). Ainda, os baixos níveis de NO produzidos pelas sintases constitutivas interagem principalmente diretamente com íons carregados positivamente na guanilato ciclase, citocromo P450 e a própria NOS (IGNARRO,

1991). Uma vez que a guanilato ciclase é ativada, ocorre um aumento intracelular de monofosfato guanosina cíclico (GMPc), que, por sua vez, ativa proteínas quinases dependentes de GMPc que medeiam às ações do NO incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, bem como efeitos antiproliferativos, antiplaquetários e antioxidantes (LUGNIER *et al.*, 1999).

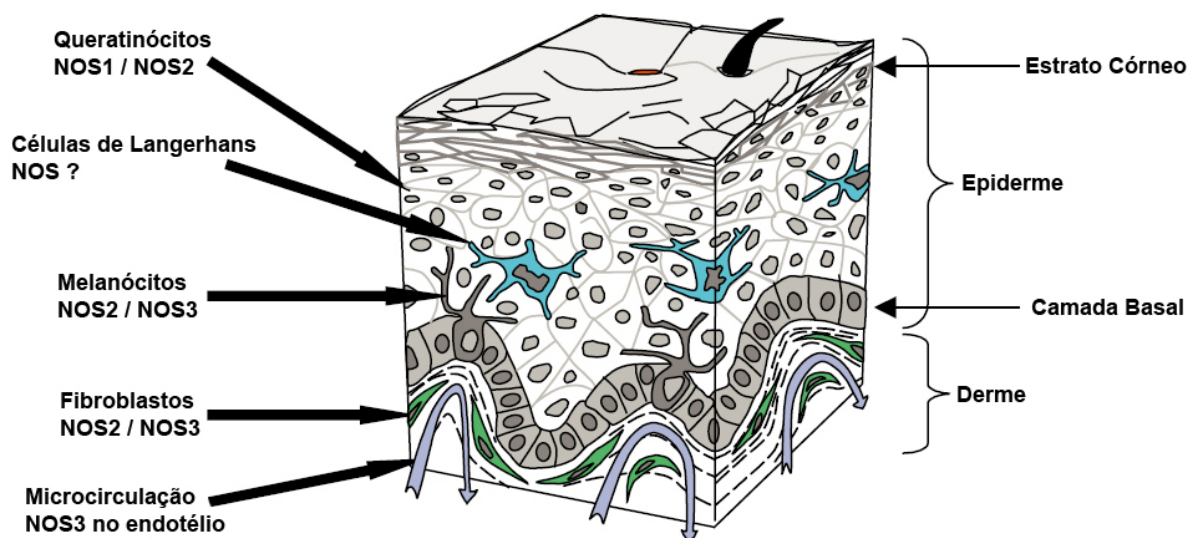


Figura 03: Representação esquemática do corte transversal da pele, demonstrando as isoformas de NOS expressas por cada tipo celular da pele (CALSGRIERSON e ORMEROD, 2004).

Diversos trabalhos indicam que níveis elevados de NO são pró-inflamatórios e que existem muitas semelhanças entre o eritema induzido por exposição UV e inflamação. Essa semelhança é observada quando a pele é exposta a radiação UV ou a substâncias químicas irritantes, as quais resultam em altos níveis de NO e alta produção de citocinas pró-inflamatórias (TEIXEIRA *et al.*, 1993; WARREN *et al.*, 1993). Em experimentos envolvendo voluntários humanos, a aplicação de uma emulsão doadora de NO na pele demonstrou recrutamento celular para o local da inflamação, além de outros eventos inflamatórios, incluindo a perda das células de Langerhans e da indução de apoptose em queratinócitos (ORMEROD *et al.*, 1999). Por outro lado, quando a produção de NO na pele é bloqueada, a

resposta inflamatória é menor. Em pele de cobaias, a resposta inflamatória (formação de edema) induzida por uma injeção intradérmica de bradicinina, histamina ou ativação do fator de agregação plaquetária é atenuada pela co-injeção com o inibidor da NOS, N^G-nitro-L-arginina-metil ester.HCl (L-NAME) (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

O NO formado constitutivamente por NOS3 é responsável por manter baixo tônus vascular e impedir a adesão de leucócitos e plaquetas à parede vascular (IGNARRO, 2002). Enquanto que a NOS2 está claramente envolvida em uma série de reações inflamatórias da pele devido ao seu papel como vasodilatador, causando aumento da permeabilidade vascular, edema, eritema e acentuada infiltração de células locais através do aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação da pele humana (RHODES *et al.*, 2001; CALS-GRIERSON e ORMEROD, 2004). Porém, a produção excessiva de NO pela NOS2 é considerada importante no decurso de várias doenças cutâneas. Foi verificado que em biópsias de pacientes com doenças inflamatórias de pele, como psoríase, cancros da pele, lúpus eritematoso e dermatose, existe uma desregulação na expressão de NOS2 (KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1994; KAGOURA *et al.*, 2001). Além disso, a inibição local da geração de NO reduz o eritema e o edema em modelos animais, em pacientes com dermatite atópica (DA) ou psoríase (MORITA *et al.*, 1995). Foi demonstrado ainda, que no início da DA ocorre um aumento nos níveis séricos de NO (TANIUCHI *et al.*, 2001) que parece estar relacionado com a gravidade clínica (principalmente quanto a área das lesões) e contagem de eosinófilos. De fato, a presença de um aumento na expressão de NOS2 na vasculatura dérmica e em células inflamatórias perivasculares foi verificada em lesões na pele de pacientes com AD durante o período de exacerbação da doença (ROWE *et al.*, 1997). Assim, o NO produzido

localmente, sem afetar os níveis sistêmicos, leva à exacerbação das lesões cutâneas, principalmente através das suas ações vasodilatadoras, no desenvolvimento de edema e do eritema. Em um estudo semelhante realizado em pacientes adultos com AD não foi encontrado uma diferença significativa entre os níveis de NO no período de exacerbação e de remissão da doença. Foi verificado, no entanto, que os níveis de NO aumentaram nos pacientes que apresentaram uma remissão parcial da doença, caracterizada por uma inflamação persistente da pele (GUZIK *et al.*, 2002).

O NO também é capaz de estimular as células epiteliais a produzirem e liberarem quimiocinas (FRANK *et al.*, 2002) além de fatores de crescimento, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (BROWN *et al.*, 1988; WERNER, 1998). O KGF é liberado pela ativação dos fibroblastos (em particular pela IL-1) estimulando a proliferação e migração de queratinócitos. Além disso, altos níveis de VEGF são encontrados em epitélios hiperproliferativos, o que parece ser importante para a proliferação de queratinócitos e angiogênese (FRANK *et al.*, 1999).

Uma primeira linha de evidências sugere que o NO é um regulador da proliferação de queratinócitos, uma vez que inibidores da NOS ou EGF causam inibição da proliferação dessas células induzida por citocinas inflamatórias (HECK *et al.*, 1992). O NO possui ainda, propriedades mitogênicas sobre os queratinócitos, as quais foram comprovadas em diversos modelos de reparo através da inibição da atividade enzimática da NOS, resultando em diminuição da proliferação epitelial durante a reparação de lesões de pele causadas por exposição à radiação UV (BENRATH *et al.*, 1995), incisões cutâneas (STALLMEYER *et al.*, 1999), e também

queimaduras (AKCAY *et al.*, 2000). Outras evidências sugerem que a adição exógena de NO sobre a ferida é capaz de induzir a expressão de importantes mediadores da cicatrização, como VEGF, o que foi observado em queratinócitos (*in vitro*) (FRANK *et al.*, 1999). Outro estudo *in vitro* verificou que baixas concentrações (0,01 - 0,25 mM) de doadores de NO estimulam a proliferação de queratinócitos, enquanto altas concentrações (>0,5 mM) os mantêm citostáticos (KRISCHEL *et al.*, 1998). Curiosamente, este evento parece ser devido à influência do ânion superóxido na célula, o que determinaria a capacidade mitogênica do NO (VALLETTE *et al.*, 1998). Juntos, o ânion superóxido e o NO formam peroxinitrito que inibe a proliferação de queratinócitos de forma dose-dependente, sendo que a remoção deste ânion superóxido reduz o efeito inibitório (CALSGRIERSON e ORMEROD, 2004). Contudo, é claro o papel chave do NO no processo de cicatrização devido a sua influência sobre a proliferação de queratinócitos, ajudando a promover a repitelização da ferida (BENRATH *et al.*, 1995; VALLETTE *et al.*, 1998; STALLMEYER *et al.*, 1999).

Além de sua função efetora direta, o NO funciona também como um potente fator imunoregulatório. O exato papel do NO na regulação imune ainda é ambígua, mas é considerado um inibidor da expressão dos genes envolvidos na proliferação e crescimento celular, além de ter sido demonstrado possuir efeitos antiapoptóticos (KRONCKE *et al.*, 2001). Estudos com camundongos sugerem que o NO derivado de células apresentadoras de antígenos e monócitos podem inibir a proliferação de células T, em particular do subgrupo Th1 (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1994; BECHEREL *et al.*, 1995).

A psoríase é uma desordem inflamatória crônica da pele, a qual exhibe diminuição na função da barreira. As principais características da doença são

hiperproliferação de queratinócitos com diferenciação anormal levando a um defeito na formação de barreira, alterações vasculares e infiltração de células inflamatórias. Vários estudos acerca do tecido cutâneo têm sugerido que a NOS1 e a NOS2, podem desempenhar papéis fundamentais no processo de reparo e na modulação da proliferação da pele (CALSGRIERSON e ORMEROD, 2004).

Estudos recentes sugerem que em queratinócitos de epiderme psoriática há um aumento dos níveis de NO, levando à liberação de cálcio das reservas internas (IKEYAMA *et al.*, 2007). Alguns autores observaram uma modesta expressão de NOS nas paredes de vasos em pele psoriática. Além do mais, em cultura de queratinócitos tem sido demonstrado que o aumento das concentrações de NO causa mudança na proliferação para um fenótipo diferenciado (NAKAI *et al.*, 2003). Diversos estudos envolvendo a psoríase evidenciaram que, apesar dessa doença aparentemente apresentar níveis elevados de NOS2, os níveis de NO produzidos são insuficientes para induzir diferenciação celular, embora sejam suficientes para estimular o processo de proliferação celular (BRUCH-GERHARZ *et al.*, 2003). Apesar dessas evidências, o envolvimento do NO sobre a proliferação das células epidérmicas é ainda pouco conhecido.

Sendo assim, o intuito desse trabalho é obter uma melhor compreensão do papel do NO na pele, desencadeando avanços na elucidação dos efeitos do NO no processo de hiperproliferação epidermal, possibilitando talvez uma nova contribuição para o tratamento de condições patológicas cutâneas. Para isso, o presente trabalho propôs estudar a participação das NOS no processo de inflamação crônica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do NO no processo inflamatório e de hiperproliferação da pele no modelo animal de inflamação crônica induzida pela múltipla aplicação tópica de óleo de cróton em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito da aplicação de inibidores das enzimas NOS no modelo de edema de orelha causado por múltipla aplicação de óleo de cróton, analisando o edema e peso.

Investigar o resultado da aplicação de doador de NO no modelo de edema de orelha causado por múltipla aplicação de óleo de cróton, analisando o edema e peso.

Analisar histologicamente a ação do tratamento com inibidores das enzimas NOS e do doador de NO no modelo de edema de orelha causado por múltipla aplicação de óleo de cróton.

Avaliar o efeito de inibidores das enzimas NOS e do doador de NO sobre a proliferação celular na epiderme de animais submetidos ao modelo de indução de edema por múltipla aplicação de óleo de cróton.

Investigar a ação do tratamento com inibidores das enzimas NOS e do doador de NO sobre a migração de leucócitos (neutrófilos e monócitos) nos animais submetidos ao modelo de indução de edema por múltipla aplicação de óleo de cróton.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Todos os procedimentos foram realizados em camundongos adultos machos da variedade Swiss pesando entre 25 a 35 g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em um dos sete grupos (n = 7-10 por grupo). Comida e água foram fornecidas *ad libitum* e os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h com temperatura controlada (22 ± 2 °C). Todos os procedimentos com animais foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética em Experimental Animal da Universidade Federal do Paraná sob o protocolo número 299.

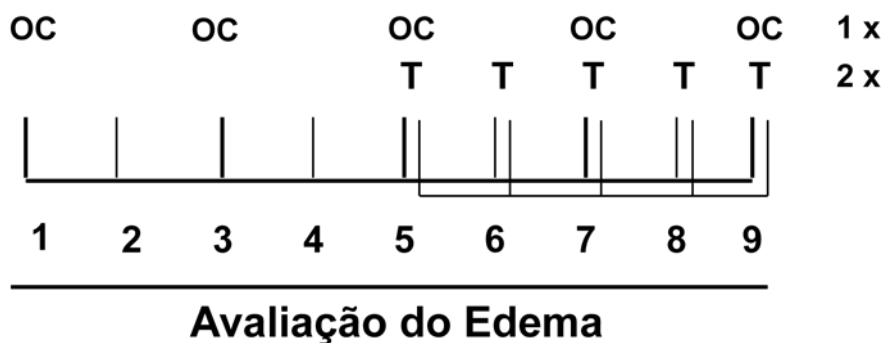
3.2. PROTOCOLO ANIMAL

O processo inflamatório crônico foi induzido na orelha direita dos animais pela aplicação múltipla de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) durante nove dias em dias alternados. Os camundongos foram tratados topicamente com o N^G-nitro-L-arginina-metil ester.HCl (L-NAME) (10 µmol/orelha), aminoguanidina (AG) (10 µmol/orelha), nitroprussiato de sódio desidratado (SNP) (2,5 µmol/orelha), 7-nitroindazole (7-NI) (1 µmol/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha), sendo realizados duas vezes por dia a partir do quinto dia. A espessura da orelha foi medida antes do início do experimento e após a indução do processo inflamatório, realizadas na região próxima à extremidade medial da orelha direita dos camundongos e o edema

expresso como o aumento da espessura (mm) da orelha. As medições do edema foram realizadas diariamente utilizando um micrômetro digital (Great, MT-04513). Para minimizar as variações na técnica, os experimentos foram realizados sempre por um único investigador. O óleo de cróton, dexametasona e 7-NI foram dissolvidos em 20 µl de acetona enquanto L-NAME, AG e SNP foram dissolvidas em 20 µl de água-acetona (5% v/v), aplicados na orelha direita de cada camundongo.

No último dia do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e círculos de 6 mm de tecido da orelha foram coletados, pesados e submetidos à avaliação histológica e imunohistoquímica (PCNA) (n = 5 por grupo) e ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) (n = 5 por grupo).

O decorrer do experimento foi realizado conforme o esquema mostrado abaixo, onde OC = indução do edema com óleo de cróton e T = Dias de tratamento.



3.3. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EPIDERME

Amostras das orelhas foram fixadas em solução ALFAC (85% de etanol 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial), desidratadas e emblocadas em parafina. Os blocos foram seccionados em cortes de 5 µm e esticados em lâminas. Os cortes foram hidratados em xilol, seguido por seqüência decrescente de

etanol, finalizando com coloração em hematoxilina e eosina. Para avaliar a espessura da epiderme, os cortes foram fotografados em aumento de 200x e as fotografias analisadas com o programa ImageJ[®] versão 1,41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA). A espessura da epiderme foi avaliada em cinco regiões ao longo de cada imagem, sendo a média das medidas expressa em μm .

3.4. MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Cortes de 5 μm obtidos dos blocos de parafina com as amostras das orelhas, preparados como descrito anteriormente, foram esticados em lâminas silanizadas. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas duas vezes em xilol, 10 min cada, e reidratadas em concentrações de álcool decrescentes 100%, 95%, 80% e 70%. Para bloqueio de radicais aldeído, os cortes foram tratados com glicina (0,1 M) por 2 min, enquanto que para o bloqueio de peroxidase endógena os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio em metanol a 3% por 10 min. Em seguida os cortes foram tratados com tampão fosfato (PBS) com 1% de albumina sérica bovina (BSA) por 30 min, para redução da marcação não específica. Para a detecção do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), as lâminas foram incubadas com 1:100 do anticorpo policlonal anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) diluído em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida para 2 h, após este tempo os cortes foram lavados com PBS/BSA 1%. Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) diluído 1:100 em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 1 h. Os sítios de ligação para

peroxidase foram detectadas por coloração usando cromógeno diaminobenzidina (Kit de substrato DAB), incubadas por 15 min. O excesso de cromógeno foi retirado em água corrente. Dentre todas as etapas, os cortes foram lavados duas a três vezes em PBS. Finalmente, as lâminas contendo os cortes foram desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (ATHAR *et al.*, 2004). Para avaliação da marcação dos cortes foi utilizada lente ocular graduada e a marcação foi avaliada em áreas representativas com aumento de 400x. A quantificação da marcação da proteína PCNA foi realizada em 3-5 cortes histológicos distintos de cada grupo, sendo escolhidos 5 diferentes fotos de forma randômica de cada corte. A quantificação foi expressa em número de células marcadas por foto utilizando o programa ImageJ[®] versão 1,41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.5. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO

A atividade da enzima MPO é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido. Para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi utilizada a metodologia de BRADLEY e colaboradores (1982) modificada por DE YOUNG e colaboradores (1989). As amostras de tecido (círculos de 6 mm de tecido) das orelha de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton, foram pesadas e adicionadas a 0,75 ml de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizadas por 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 ml de tampão fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram colocadas em microtubos e

centrifugadas a 11.200 xg a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µl do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 µl de uma mistura contendo 100 µl de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µl de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µl de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µl de tetrametilbenzidina.HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%, promoveu o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 3 min, adicionando 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808) cuja leitura da absorbância é feita a 630 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

3.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG

A atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido. A atividade da NAG foi avaliada utilizando a metodologia de SANCHEZ e MORENO (1999). As amostras de tecido (círculos de 6 mm de tecido) das orelha de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton foram pesadas e adicionadas a 0,75 ml de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado 0,75 ml de tampão fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 ml) foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 11.200 xg a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 25 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 100 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi

iniciada pela adição de 25 μ L de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água miliQ. Em seguida a placa foi incubada a 37°C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 μ l de tampão glicina 200 nM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura da absorbância é feita a 405 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

3.7. DROGAS E REAGENTES

As drogas e reagentes utilizados foram: Álcool Etílico Absoluto adquirido da Farmanilquima (Curitiba, Brasil); 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida, Albumina sérica bovina (BSA), Citrato de sódio desidratado, Dexametasona, Glicina anidra, Brometo de Hexadeciltrimetilamonio (HTAB), Nitroprussiato de sódio desidratado, Óleo de cróton e Tetrametilbenzidina (TMB) adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis MO); Kit substrato DAB e Kit retriavagem A adquirido da BD Biosciences (São Diego, CA, EUA); Acetona, Ácido acético glacial, Aminoguanidina, Bifosfato de sódio (NaH_2PO_4), Cloreto de sódio, Dimetilformamida, Formaldeído, Monofosfato de sódio (Na_2HPO_4) e Parafina adquiridos da Merck Biosciences (Alemanha); Acetato de sódio anidro P.A., Eosina, Etanol Absoluto, Floxina B, Hematoxilina, Metanol, Peróxido de hidrogênio 30% e Xilol adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); N^G-nitro-L-arginine-methyl ester.HCl adquirido da Alexis Biochemicals - Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA, EUA); 7-Nitroindazole adquirido da A.G. Scientific, Biochemical Manufacturer (São Diego, CA, EUA); Anticorpo anti-PCNA (C-20) cabra policlonal IgG e Anticorpo de burro

anti-cabra IgG HRP (horseradish peroxidase) adquiridos da Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, EUA).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm S.E.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 3.03, São Diego, Califórnia, EUA.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON

As múltiplas aplicações do óleo de cróton (0,4 mg/orelha, tópico) induziram a formação do edema na orelha dos camundongos 6 h após a primeira aplicação, aumentando nos dias seguintes e atingindo o efeito máximo no quinto dia, quando comparado ao grupo veículo (acetona). Todos os tratamentos (duas vezes por dia, 12 h/12 h, tópico) foram realizados do 5^o ao 9^o dia do experimento. A aplicação do corticóide dexametasona (0,1 mg/orelha), utilizado como controle positivo, foi capaz de impedir a formação do edema durante todo o período de tratamento, começando pelo 1^o dia (5^o dia de experimento), quando comparado ao grupo controle (Figura 04 e 05). O grupo L-NAME (10 μ mol/orelha) também mostrou uma redução na formação do edema durante os 5 dias de tratamento, quando comparado ao grupo controle (Figura 04a). Já os dois inibidores específicos de NOS testados, AG (inibidor de NOS2, 10 μ mol/orelha) e 7-NI (inibidor de NOS1, 1 μ mol/orelha), quando aplicados topicamente durante 5 dias, não foram capazes de causar alteração no edema produzido por múltiplas aplicações de óleo de cróton (Figura 04b e 05a, respectivamente). No entanto, o uso do doador de NO SNP (2,5 μ mol/orelha) causou um aumento significativo no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, a partir do 3^o dia de tratamento (Figura 05b).

Figura 04: Efeito do **(a)** L-NAME (10 μ mol/orelha), **(b)** AG (10 μ mol/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (água-acetona, 5 % v/v) no edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia de experimento. O edema foi medido pela diferença entre a espessura basal da orelha direita e sua espessura durante os 9 dias após a indução do edema. Os pontos representam à média e barras verticais o E.P.M. de 5-10 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. * $P < 0,05$; e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados o grupo dexametasona e controle. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados os grupos tratamento e controle.

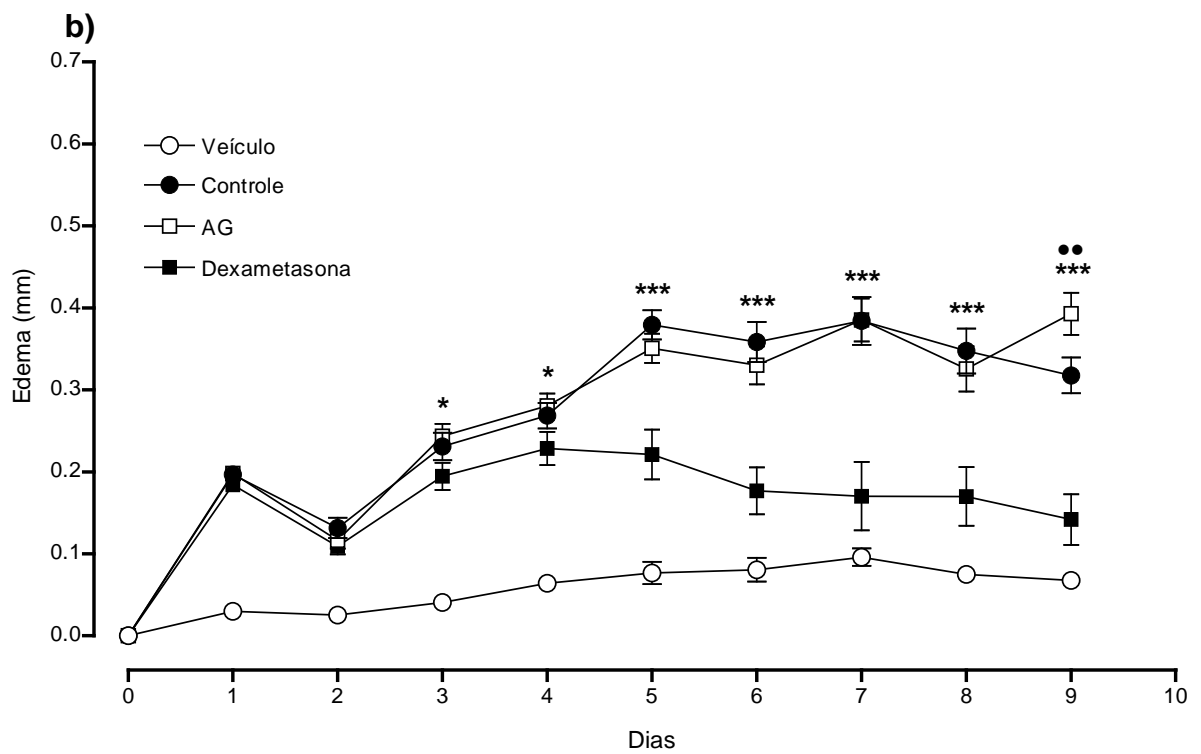
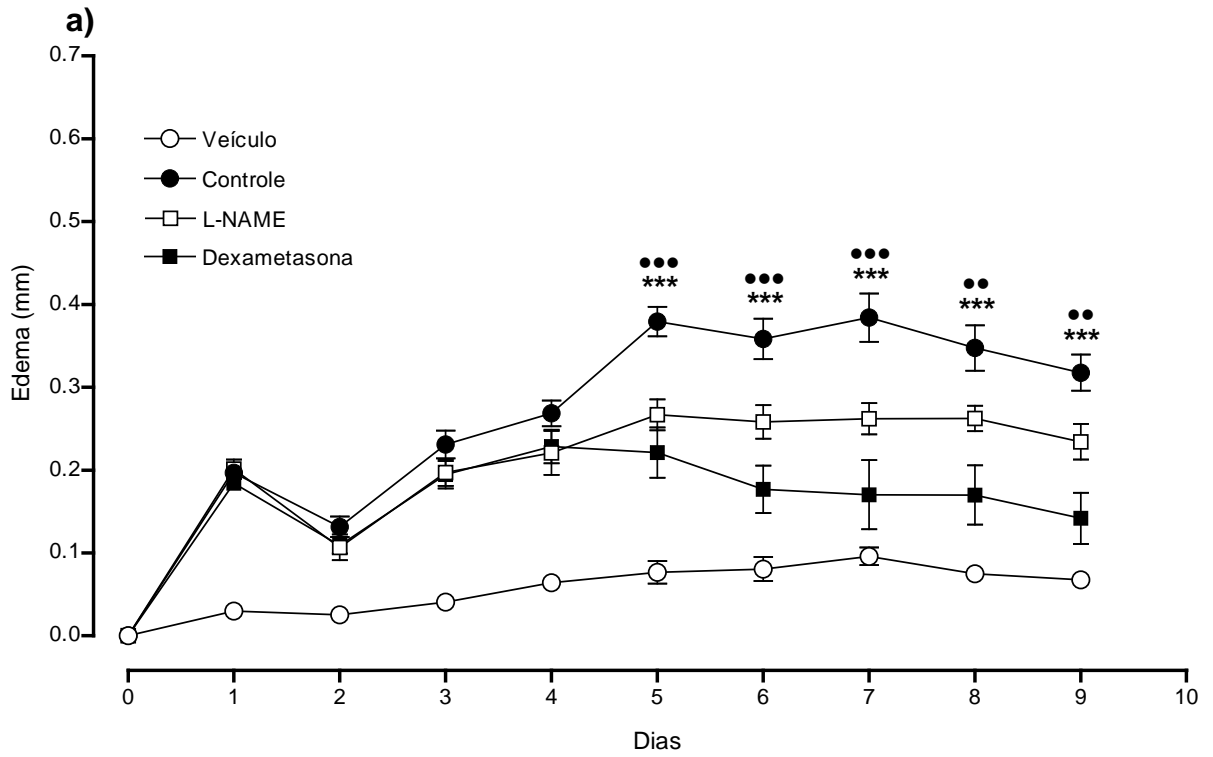
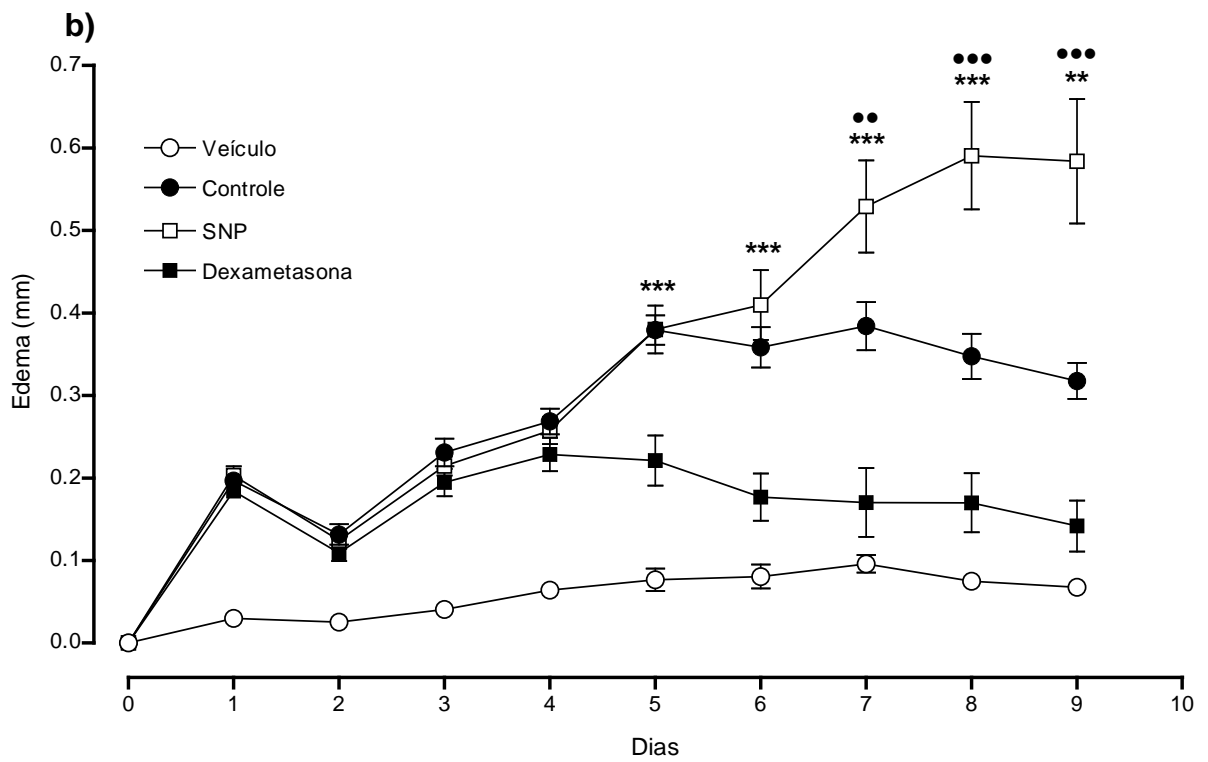
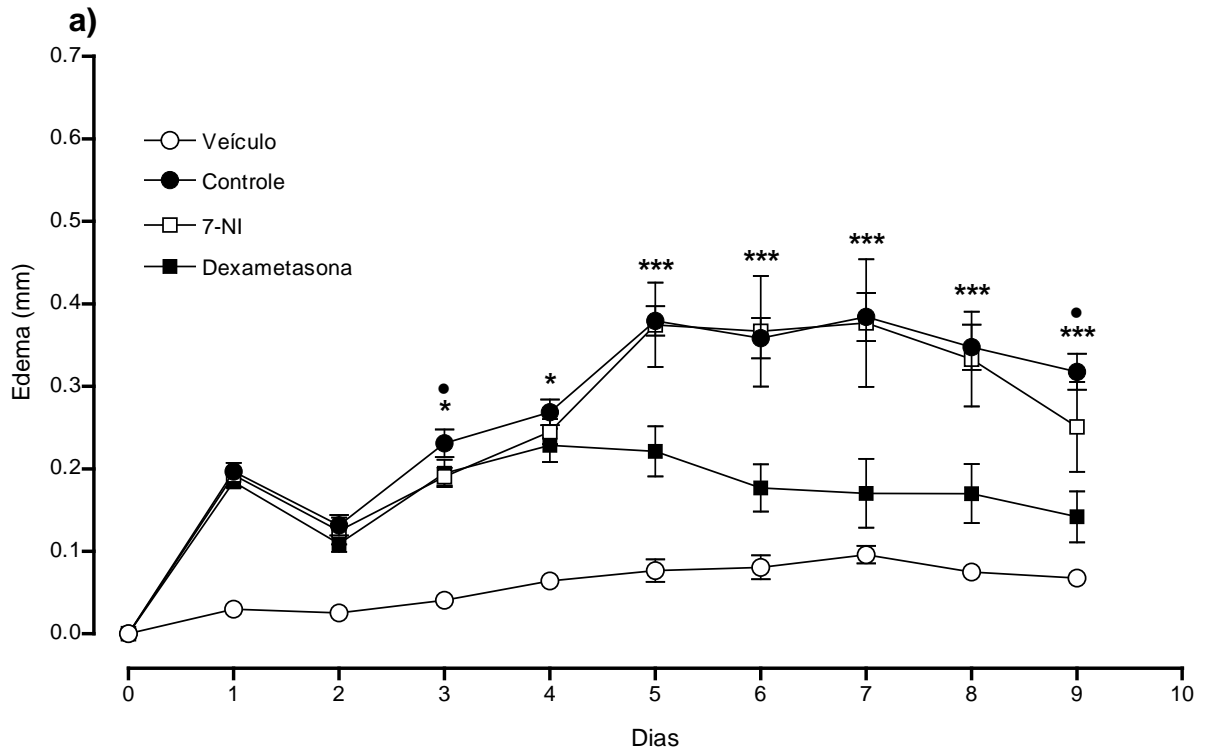


Figura 05: Efeito do **(a)** 7-NI (1 μmol /orelha), **(b)** SNP (2,5 μmol /orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (água-acetona, 5 % v/v) no edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia de experimento. O edema foi medido pela diferença de espessura basal da orelha direita e sua espessura durante os 9 dias após a indução do edema. Os pontos representam à média e barras verticais o E.P.M. de 5-10 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados o grupo dexametasona e controle. • $P < 0,05$; •• $P < 0,01$ e ••• $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados os grupos tratamento e controle.



Ao final do experimento (9º dia de tratamento) as repetidas aplicações de óleo de cróton promoveram um aumento significativo no peso da orelha dos camundongos do grupo controle ($24,3 \pm 1,4$ mg) quando comparado aos grupos naive ($8,3 \pm 0,2$ mg) e veículo ($10,5 \pm 0,2$ mg). Os tratamentos com L-NAME, 7-NI e dexametasona causaram redução no aumento de peso das orelhas em $16,9 \pm 4,8$; $18,3 \pm 9,1$ e $43,8 \pm 2,0$ %, respectivamente. Já os tratamentos com AG e SNP geraram aumento em $24,9 \pm 5,7$ e $22,0 \pm 9,2$ %, respectivamente, no peso das orelhas quando comparado ao grupo controle (Figura 06).

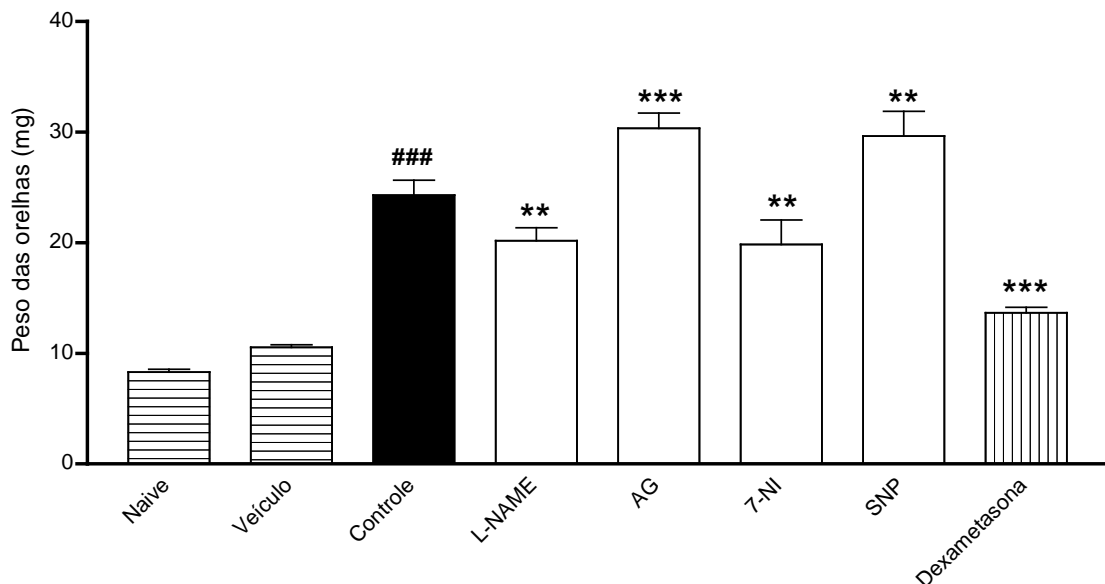
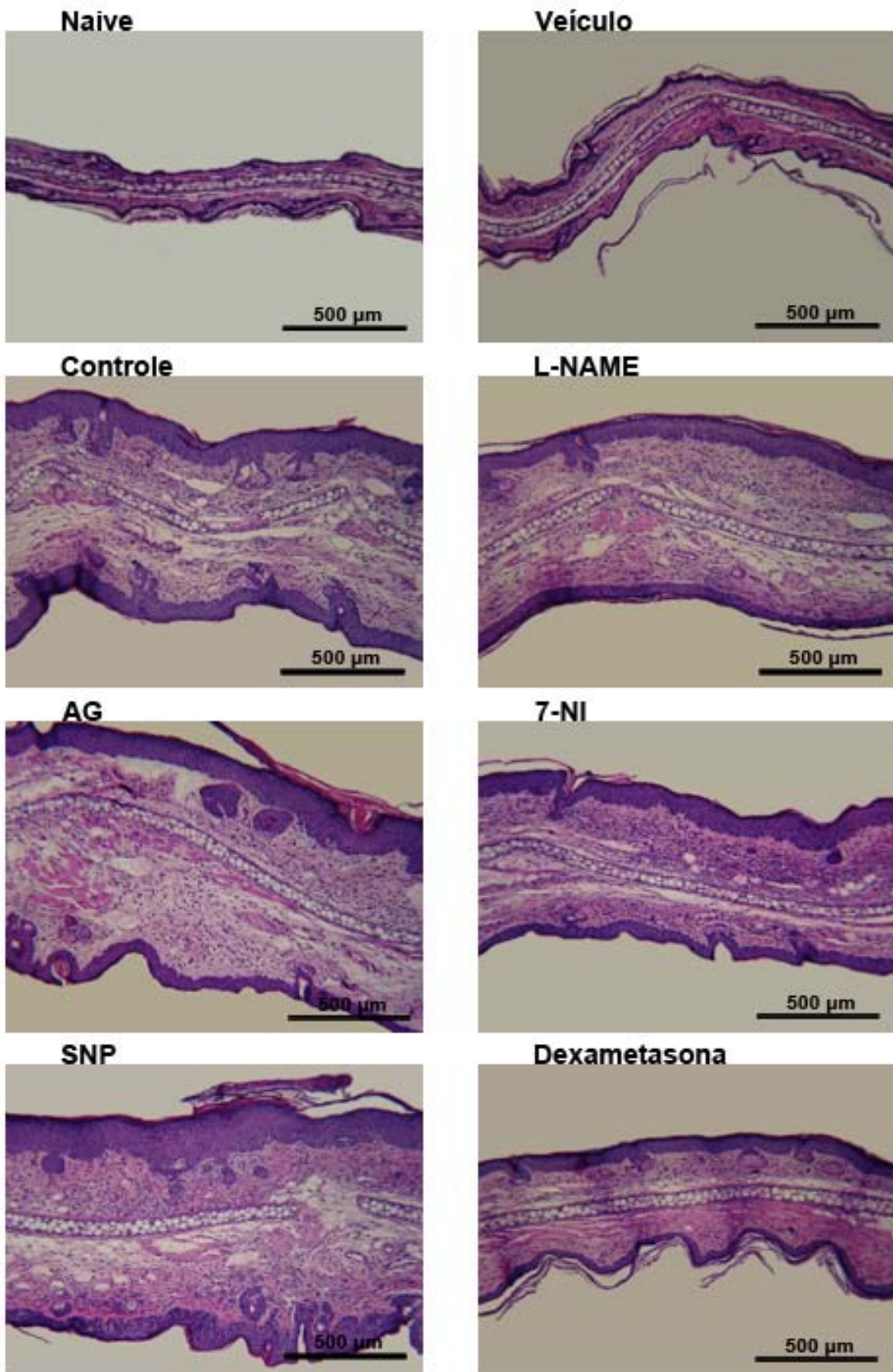


Figura 06: Efeito do L-NAME ($10 \mu\text{mol/orelha}$), AG ($10 \mu\text{mol/orelha}$), 7-NI ($1 \mu\text{mol/orelha}$), SNP ($2,5 \mu\text{mol/orelha}$), dexametasona ($0,1 \text{ mg/orelha}$) e veículo (água-acetona, 5 % v/v) no peso das orelhas no 9º dia após múltiplas aplicações de óleo de cróton ($0,4 \text{ mg/orelha}$). Todos os dados apresentados representam a média \pm E.P.M. de 5-10 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle.

4.2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA EPIDERME

Amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm), submetidos à múltipla aplicação de óleo de cróton, foram utilizadas para avaliar o processo de hiperproliferação celular na epiderme. O óleo de cróton promoveu um aumento na espessura da epiderme no grupo controle ($133,8 \pm 8,0 \mu\text{m}$) quando comparado com os grupos naive ($16,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$) e véculo ($25,6 \pm 1,3\mu\text{m}$). Todos os inibidores de NOS testados, foram capazes de reduzir o aumento na espessura da epiderme em $28,2 \pm 5,3\%$ (L-NAME), $20,7 \pm 5,3\%$ (AG) e $20,5 \pm 3,4\%$ (7-NI), bem como a dexametasona ($53,5 \pm 3,5\%$). No entanto, com a aplicação do doador de NO (SNP) ocorreu aumento de $35,6 \pm 5,7\%$ na espessura da epiderme, quando comparado ao grupo controle (Figura 08). A figura 07 apresenta fotos representativas de cortes histológicos de amostras de tecidos das orelhas dos camundongos após a múltipla aplicação tópica do óleo de cróton, demonstrando que os tratamentos com L-NAME, AG, 7-NI e dexametasona apresentam uma redução na espessura da epiderme. O tratamento com o doador de NO (SNP) promoveu um aumento na espessura da epiderme comparando ao grupo controle.

Figura 07: Imagens representativas da histologia de cortes transversais de orelhas camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 200x, escala de 500 μm) coletadas no 9º dia após a múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Grupos: naive (sem tratamento), veículo (água-acetona, 5% v/v), controle, L-NAME (10 μmol /orelha), AG (10 μmol /orelha), 7-NI (1 μmol /orelha), SNP (2,5 μmol /orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento.



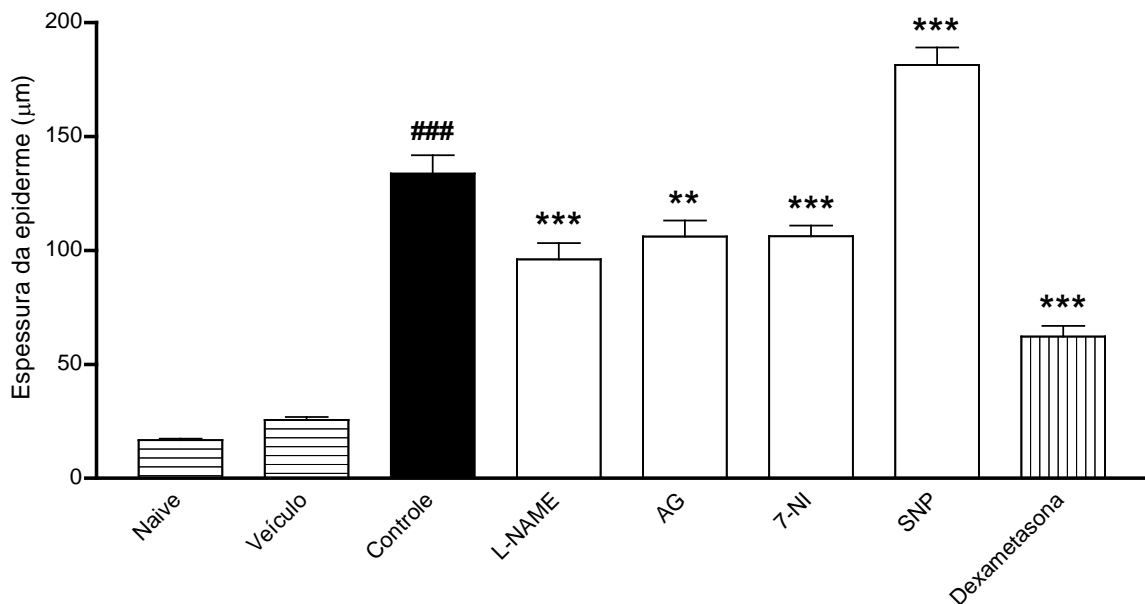


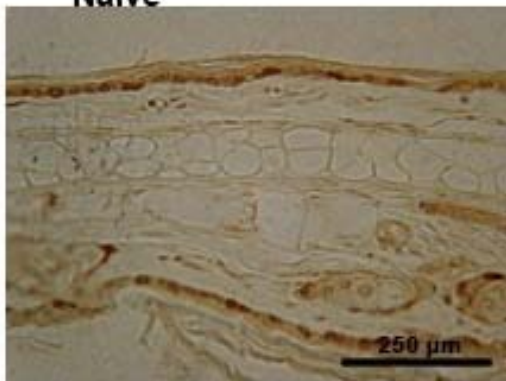
Figura 08: Efeito do L-NAME (10 µmol/orelha), AG (10 µmol/orelha), 7-NI (1 µmol/orelha), SNP (2,5 µmol/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (água-acetona, 5% v/v) sobre a espessura epiderme no 9º dia após múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento. Todos os dados apresentados são média ± S.E.M. de 12-24 cortes corados com hematoxilina-eosina, como descrito anteriormente. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparado ao grupo controle.

4.3. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

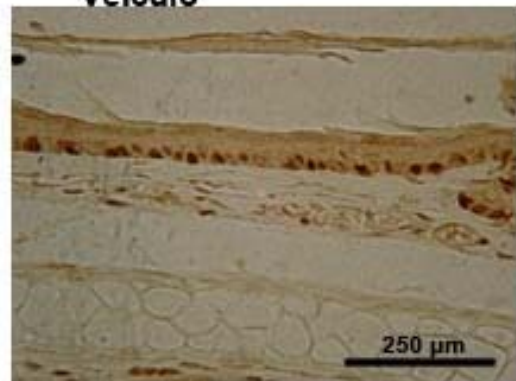
O número de células em proliferação na pele das orelhas tratadas com múltiplas aplicações de óleo de cróton foi avaliado através da imunomarcagem para PCNA. A Figura 09 mostra fotos representativas da imunohistoquímica para PCNA a qual permitiu avaliar as mudanças no padrão de proliferação celular no tecido da orelha direita dos camundongos após a múltipla aplicação de óleo de cróton e os respectivos tratamentos pela via tópica. A múltipla aplicação do óleo de cróton promoveu aumento significativo no número de células em proliferação na pele da orelha do grupo controle ($87,1 \pm 6,8$ células/campo), quando comparado com os grupos naive ($19,5 \pm 1,6$ células/campo) e veículo ($37,7 \pm 2,3$ células/campo) (Figura 10). Os animais tratados topicamente com L-NAME, AG e dexametasona apresentaram uma redução no número de células em proliferação ($57,3 \pm 3,9$; $73,3 \pm 2,7$ e $37,0 \pm 1,8$ células/campo, respectivamente), enquanto que no grupo SNP esta resposta foi amplificada ($100,8 \pm 6,7$ células/campo). Já o grupo 7-NI não mostrou nenhuma mudança no número de células em proliferação ($92,6 \pm 9,2$ células/campo), quando comparados ao grupo controle (Figura 10).

Figura 09: Imagens representativas da marcação para PCNA por imunohistoquímica em cortes transversais de orelhas de camundongos coletados no 9º dia após a múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Grupos: naive (sem tratamento), veículo (água-acetona, 5% v/v), controle, L-NAME (10 µmol/orelha), AG (10 µmol/orelha), 7-NI (1 µmol/orelha), SNP (2,5 µmol/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento. Aumento de 400x, escala de 250 µm.

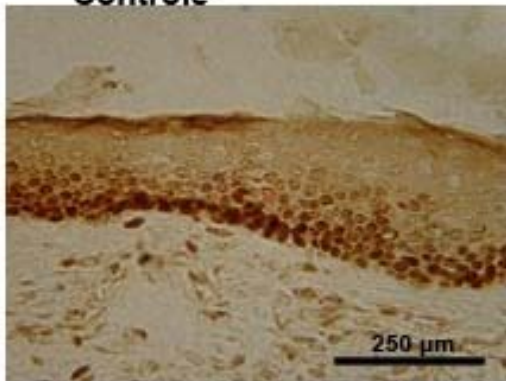
Naive



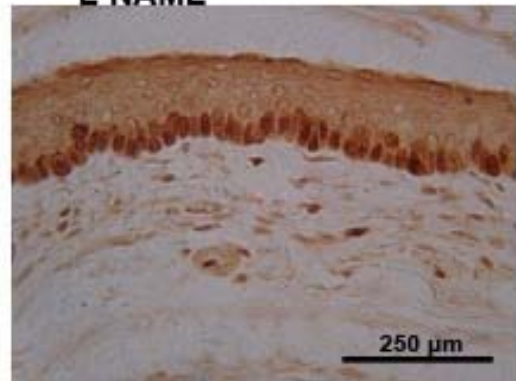
Veículo



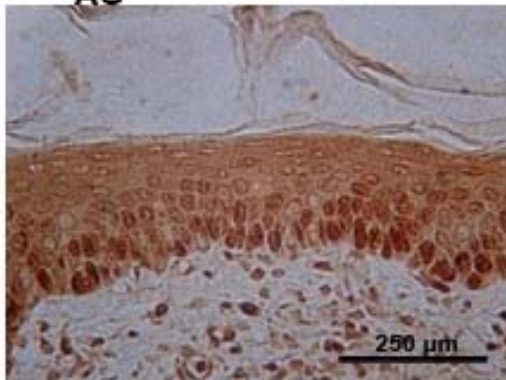
Controle



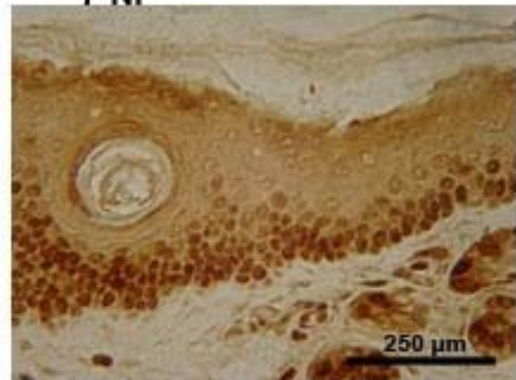
L-NAME



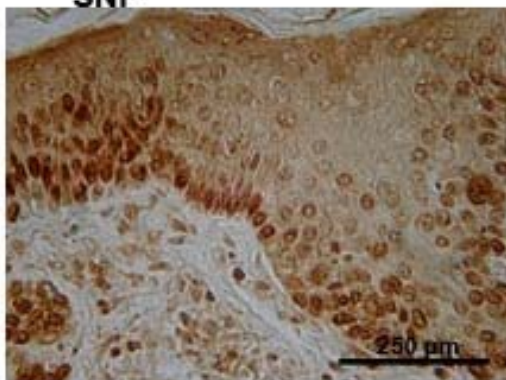
AG



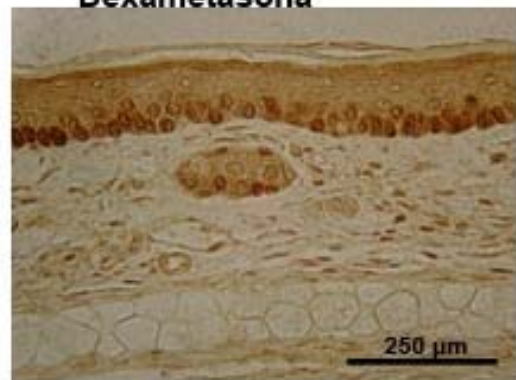
7-NI



SNP



Dexametasona



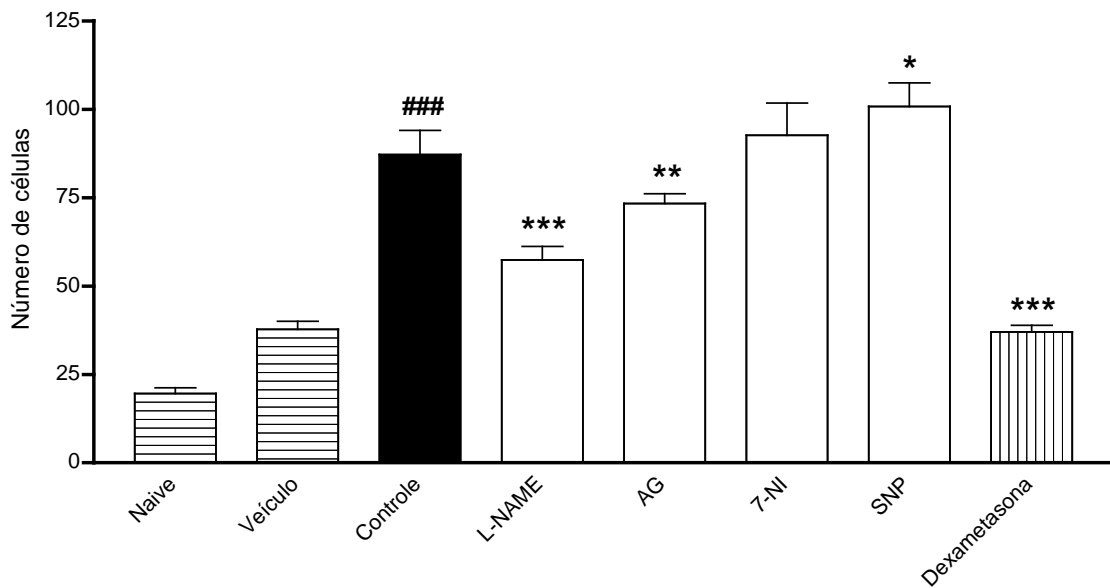


Figura 10: Avaliação imunohistoquímica da proliferação celular. Efeito do L-NAME (10 μmol /orelha), AG (10 μmol /orelha), 7-NI (1 μmol /orelha), SNP (2,5 μmol /orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (água-acetona, 5% v/v) sobre a marcação imunohistoquímica para proliferação celular no 9º dia após a múltipla aplicação de óleo de cróton (0,4 mg/orelha). Os tratamentos foram iniciados no quinto dia do experimento. Todos os dados apresentados são média \pm S.E.M. do número de células avaliados em 9-21 cortes marcados com anticorpo anti-PCNA. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância, quando comparado com o grupo veículo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparado ao grupo controle.

4.4. AVALIAÇÃO DO ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO

A MPO é um marcador de leucócitos polimorfonucleares e a determinação da sua atividade indica a infiltração leucocitária. Como esperado, o tratamento repetido com óleo de cróton na orelha promoveu um aumento significativo na atividade da MPO no grupo controle, quando comparado aos grupos naive e veículo (Figura 11). Nas orelhas tratadas com AG e SNP, a atividade da MPO foi aumentada em $52,8 \pm 23,9\%$ e $74,4 \pm 47,9\%$, respectivamente, enquanto que no grupo dexametasona foi reduzida em $47,0 \pm 3,4\%$, em comparação ao grupo controle. Os demais tratamentos (L-NAME e 7-NI) não foram capazes de promover qualquer alteração significativa na atividade MPO quando comparado ao grupo controle (Figura 11).

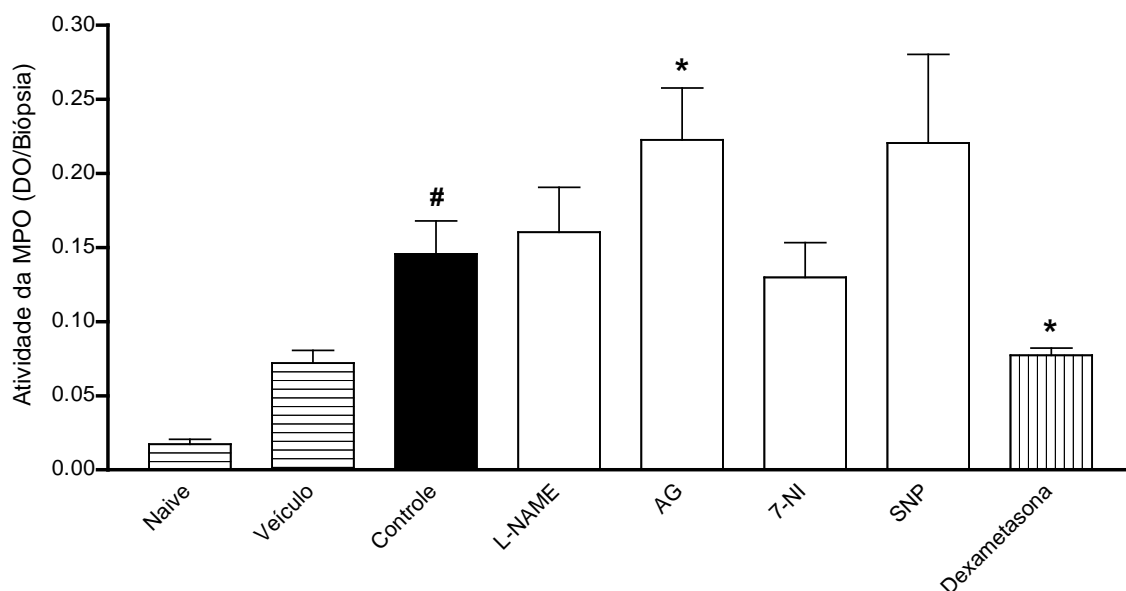


Figura 11: Efeito do L-NAME (10 μmol /orelha), AG (10 μmol /orelha), 7-NI (1 μmol /orelha), SNP (2,5 μmol /orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (água-acetona, 5% v/v) sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase em sobrenadante de orelhas tratadas com óleo de cróton. As atividades enzimáticas nas orelhas foram

mensuradas no 9º dia após tratamento com múltipla aplicação de óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm S.E.M. de 3-6 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. # $P < 0,05$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo. * $P < 0,05$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle.

4.5. AVALIAÇÃO DO ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NAG

A atividade enzimática da NAG é usada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido. A inflamação da pele induzida por múltiplos tratamentos com óleo de cróton promoveu um aumento da atividade da NAG no tecido de camundongos controle quando comparada aos grupos naive e veículos (Figura 12). Orelhas tratadas com 7-NI e dexametasona apresentaram uma diminuição em $14,6 \pm 6,1$ e $34,4 \pm 7,2\%$, respectivamente, da atividade da NAG, em comparação com resultados do grupo controle. No entanto, a aplicação tópica de AG aumentou em $16,35 \pm 6,3\%$ a atividade da NAG induzida pelo tratamento cutâneo repetido com óleo de cróton. Os outros grupos (SNP e L-NAME) não mostraram nenhuma alteração na atividade enzimática da NAG quando comparado ao grupo controle (Figura 12).

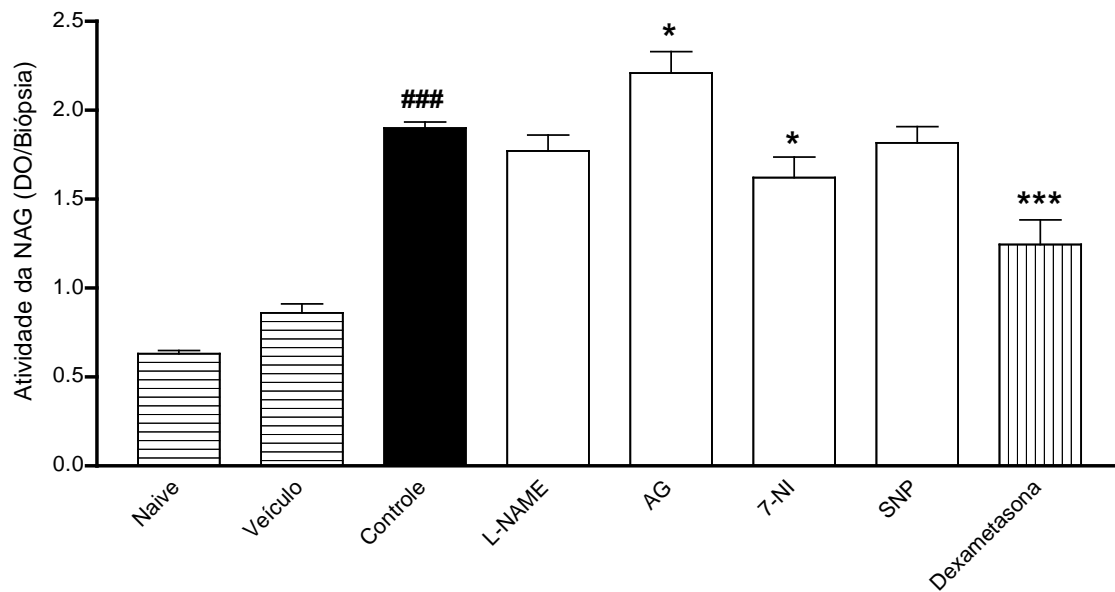


Figura 12: Efeito do L-NAME (10 μmol /orelha), AG (10 μmol /orelha), 7-NI (1 μmol /orelha), SNP (2,5 μmol /orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) e veículo (água-acetona, 5% v/v) sobre a atividade enzimática da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) em sobrenadante de orelhas tratadas com óleo de cróton. As atividades enzimáticas nas orelhas foram mensuradas no 9º dia após tratamento com múltiplas aplicações de óleo de cróton. Todos os dados apresentados são média \pm S.E.M. de 3-6 animais. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparado ao grupo controle.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O processo de hiperproliferação de queratinócitos com diferenciação anormal leva a uma formação defeituosa da barreira, respostas aberrantes ou exageradas na formação de fatores de crescimento, alterações vasculares, e migração de células inflamatórias cutâneas, caracterizando algumas doenças inflamatórias cutâneas crônicas, tais como a psoríase, doenças inflamatórias alérgicas, feridas crônicas, entre outras (GNIADOCKI, 1998). Muitos estudos são realizados a fim de compreender estas doenças, e entre eles, muitos relatam um envolvimento significativo de NO nestes processos, no entanto, apenas alguns trabalhos tentaram demonstrar o envolvimento do NO no controle do processo de hiperproliferação da epiderme, com algumas controvérsias (BRUCH-GERHARZ *et al.*, 2003; NAKAI *et al.*, 2003; IKEYAMA *et al.*, 2007).

No presente estudo nós demonstramos através de um modelo *in vivo* que o NO possui um papel relevante na regulação hiperproliferativa de queratinócitos da epiderme em processos inflamatórios crônicos. Para isso, usamos o modelo de múltipla aplicação de óleo de cróton, promovendo um processo inflamatório e hiperproliferativo da epiderme na pele da orelha de camundongos. O constituinte ativo presente no óleo de cróton é 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), um composto ativador de PKC e promotor de tumor. A aplicação tópica de TPA é um modelo válido para a avaliação de compostos com potencial antiinflamatório. O TPA promove a inflamação cutânea através da hiperplasia epidérmica devido ao aumento da proliferação de queratinócitos e produção do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1), TNF- α e a formação de LTB₄ com um conseqüente aumento da

permeabilidade vascular e influxo de neutrófilos (JANG e PEZZUTO, 1998; MURAKAWA *et al.*, 2006).

Em nosso experimento, o tratamento com um inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) promoveu uma redução na formação de edema e peso das orelhas dos camundongos, enquanto o doador (SNP) aumentou o edema e peso. Provavelmente, parte deste efeito do NO é devido ao seu papel vasodilatador, que é claramente compreendido em diversos estudos como os que demonstram que o aumento na produção de NO pela NOS2 contribui muito para a desagregação da barreira hemato tecidual levando à infiltração celular e o extravasamento de proteínas plasmáticas; outros relatos têm sugerido um efeito totalmente oposto. Por exemplo, a exposição de leucócitos a elevadas concentrações de NO, como encontradas em vasos inflamados, mostra aumentar a produção da quimiocina IL-8 e da citocina TNF- α , reforçando assim que há um forte gradiente quimiotático no tecido danificado (VAN DERVORT *et al.*, 1994; CORRIVEAU *et al.*, 1998; MUHL *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2004). Além disso, foi relatado que a atividade NOS2 promove dilatação vascular aumentando o fluxo de leucócitos, em resposta a estímulos infecciosos (CORRIVEAU *et al.*, 1998). Ainda, outros relatos indicam que a falta da NOS2 suprime as interações entre as células endoteliais com leucócitos induzida por endotoxina bacteriana na retina e em pulmões de camundongos (SHANLEY *et al.*, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2004; IWAMA *et al.*, 2008). Coerente com estes achados, Medeiros e colaboradores demonstraram claramente que a supressão genética da NOS2 previne a infiltração celular e a formação de edema na pele após o desafio com TPA (MEDEIROS *et al.*, 2009). Contudo, observamos que o tratamento com inibidores seletivos para NOS2 e NOS1 (AG e 7-NI, respectivamente) nas doses utilizadas não alterou o edema, sugerindo que desta forma, a NOS3 é

provavelmente a enzima responsável por produzir o NO envolvido na formação do edema na orelha dos camundongos. Sendo que alguns dos papéis fisiológicos da NOS3 incluem; relaxamento dos vasos dependente do endotélio ativado pela guanilato ciclase, inibição da aderência de leucócitos, diminuição da ativação plaquetária e regula o tônus do músculo liso vascular, assim, controlando as respostas vasodilatadoras (HE e YANG, 1996).

Os queratinócitos representam cerca de 90 a 95% das células da epiderme e são formados de modo contínuo na camada basal e submetidos a um processo de diferenciação rigorosamente regulado em que se deslocam para a superfície da pele, assim, tornando-se parte do epitélio cornificado. Este processo de maturação dos queratinócitos consiste essencialmente do processo de queratinização, mas envolve uma série de eventos morfológicos e metabólicos os quais levam a proliferação e diferenciação celular, seguido da perda dos núcleos (CALSGRIERSON e ORMEROD, 2004).

Os dados obtidos em nosso estudo mostram uma significativa redução na espessura da epiderme nos animais tratados com inibidores da NOS (L-NAME, AG e 7-NI), e aumento na espessura da epiderme nos animais tratados com o doador de NO (SNP). As modificações na espessura da epiderme são visivelmente observadas na prancha com exemplares representativos dos cortes histológicos examinados (Figura 07). Estes resultados, sugerem fortemente que as duas isoformas de NOS (NOS2 e NOS1), poderiam ser responsáveis pela hiperproliferação de queratinócitos da epiderme induzida pelo NO.

A fim de confirmar as alterações induzidas pelo NO na espessura da epiderme, realizamos a imunomarcagem para antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA), tornando possível quantificar o número de queratinócitos em

processo de proliferação na camada da epiderme. O número de células em proliferação na pele dos animais tratados com L-NAME e AG foi menor quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum tratamento (controle), enquanto que o grupo tratado com SNP apresentou uma quantidade maior de células em processo de proliferação. Todas as três isoformas de NOS são expressas na pele de camundongos. As isoformas neuronal e endotelial de NOS são dependentes de cálcio e produzem baixos níveis de NO, geralmente para realização de funções de homeostase do tecido, enquanto que a NOS2 gera níveis muito mais elevados de NO de uma forma independente de cálcio, e esta, tem sido considerada envolvida em condições inflamatórias e patológicas (MCDONALD e MURAD, 1996; MICHEL e FERON, 1997; ALDERTON *et al.*, 2001). Em um estudo de Chun e colaboradores (2004), a utilização de AG reduziu parcialmente a expressão da ciclooxygenase-2 (COX-2) induzida por uma única dose da TPA, sugerindo que a expressão da COX-2 pode ser regulada pelo NO através da NOS2 na pele de camundongos (CHUN *et al.*, 2004). No presente estudo, os inibidores L-NAME e AG reduziram significativamente o processo de hiperproliferação da epiderme *in vivo*, mostrando mais uma vez a importância da NOS2 neste processo pela via do TPA. Por outro lado, o inibidor específico para NOS1 (7-NI) não alterou o número de células positivas para a marcação da proteína PCNA, embora tenha sido capaz de reduzir a espessura da epiderme. É possível que a dose de 7-NI utilizada não tenha sido suficiente para causar uma redução detectável nas células proliferativas imunomarcadas para PCNA. Assim, o envolvimento da NOS1 na proliferação de queratinócitos precisa ser melhor investigado.

Gniadecki (1998) descreveu a regulação da proliferação de queratinócitos como um processo extremamente complexo, que depende da disponibilidade de

fatores de crescimento, grau de diferenciação celular, e fixação celular ao substrato. Em condições normais, os fatores de crescimento da família dos EGF e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) parecem ser os mais importantes estimuladores de crescimento, enquanto o TGF- β é fisiologicamente relevante na inibição do crescimento. Em doenças de pele inflamatórias hiperplásicas, os queratinócitos entram em um percurso proliferativo patológico. A IL-1 é provavelmente quem inicia o processo patológico, mas a hiperproliferação epidérmica é mantida por um excesso de fatores de crescimento (TGF- α , anfiregulinas, IGF-I) e outras interleucinas (IL-4, IL-6, IL-8) (GNIADCKI, 1998).

Vários estudos têm demonstrado que o mecanismo farmacológico do NO no processo hiperproliferativo de queratinócitos baseia-se na sua interação com o NF- κ B. No entanto, os dados observados dos efeitos do NO sobre o NF- κ B são bastante controversos. De fato, o NO pode ativar a ligação do NF- κ B ao DNA ativando alguns tipos celulares, como neurônios e células mesangiais (DIAZ-CAZORLA *et al.*, 1999; SIMPSON e MORRIS, 1999), enquanto ele pode também exercer um efeito inibitório em outros, como macrófagos e células endoteliais vasculares (PENG *et al.*, 1995; DELATORRE *et al.*, 1999). A aplicação tópica do SNP na pele dorsal de camundongos causa ativação do NF- κ B através da degradação da subunidade κ B α , enquanto que a aplicação tópica de pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), um conhecido inibidor do NF- κ B, resulta em supressão da ativação do NF- κ B induzida por TPA, causando uma redução na expressão da proteína COX-2 na pele de camundongos (SURH *et al.*, 2001). Finalmente, Chun e colaboradores (2004) descreveram que dois diferentes inibidores de NF- κ B (PDTC e TPCK) suprimiram a expressão de COX-2 induzida pelo SNP na pele de camundongos. Eles também confirmaram o efeito inibitório do SN50, um peptídeo

inibidor de permeabilidade celular para translocação do NF- κ B, na expressão de COX-2 em queratinócitos, sugerindo que o NO poderia induzir expressão de COX-2 na pele de camundongos através da ativação do NF- κ B.

O NF- κ B é um fator de transcrição que reside no citoplasma de todas as células, e regula a expressão de quase 400 genes diferentes, que incluem enzimas (por exemplo, a enzima COX-2, 5-lipoxigenase, e NOS2), citocinas (como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, e quimiocinas), moléculas de aderência, moléculas reguladoras do ciclo celular, proteínas virais e fatores angiogênicos, sendo que a ativação constitutiva do NF- κ B tem sido associada a uma ampla variedade de doenças humanas (AHN e AGGARWAL, 2005). Recentemente, Medeiros e colegas (2009) mostraram que camundongos nocaute para o gene NOS2 têm um efeito notável sobre a cascata inflamatória, indicado pela diminuição da resposta edematogênica e do número de células inflamatórias infiltradas na orelha de camundongos em resposta ao tratamento com TPA. Os efeitos inflamatórios mediados pela NOS2 parecem estar associados com a sua capacidade de estimular a ativação de quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e p38 MAPK, que por sua vez, controlam os fatores transcricionais, principalmente elemento de ligação em resposta a AMPc (CREB), c-Jun e NF- κ B (MEDEIROS *et al.*, 2009).

Leucócitos são células de defesa e sua principal função é proteger nosso corpo durante a inflamação. A avaliação da atividade enzimática da MPO é freqüentemente utilizada como um indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares (BRADLEY *et al.*, 1982) e a atividade enzimática da NAG como indicativo da presença de leucócitos mononucleares (SANCHEZ e MORENO, 1999). Os efeitos do NO na migração leucocitária encontrados na literatura mostram-se bastante controversos. Alguns estudos demonstraram que a inibição da síntese de

NO leva a aumento na degranulação de mastócitos e liberação de histamina, o que aumenta a permeabilidade microvascular e infiltração leucocitária (MASINI *et al.*, 1991; GABOURY *et al.*, 1996). Estes trabalhos confirmariam a resposta apresentada pela AG, visto que sua presença aumentou a atividade das enzimas MPO e NAG, proporcionando maior infiltração leucocitária no local da inflamação do modelo crônico induzido pelo óleo de cróton na pele dos camundongos. Sugerindo desta forma que a NOS2 também deve ser a fonte de NO que proporciona a infiltração de células inflamatórias no local.

Contudo, outro estudo relata que a atividade da NOS2 promove dilatação vascular aumentando fluxo de leucócitos em resposta a estímulos infecciosos (CORRIVEAU *et al.*, 1998). Ainda, outro autor relata que a baixa concentração de NO induzida pela administração de L-NAME pode diminuir os níveis de citocinas e fatores de crescimento como o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), levando à redução da diferenciação miofibroblástica e diminuição na contração da ferida. Os baixos níveis de TGF- β 1 também podem contribuir para reduzir recrutamento de células inflamatórias ao local da lesão (AMADEU e COSTA, 2006). Estes resultados estariam de acordo com os dados obtidos com os tratamentos com SNP e 7-NI, onde o SNP promoveu um aumento ainda maior na quantidade de NO na pele durante a inflamação crônica, causando maior migração de leucócitos polimorfonucleares, enquanto a NOS1 estaria relacionada, com a migração de células mononucleares durante o estado crônico da pele.

A psoríase é uma doença inflamatória da pele caracterizada por áreas localizadas apresentando intensa hiperproliferação epidérmica (SCHON e RUZICKA, 2001). Apesar de a etiologia e patogênese da psoríase continuarem desconhecidas, acreditasse que ocorra um desequilíbrio na resposta imunes, contribuindo para o

processo de doença (SCHLAAK *et al.*, 1994; BRUCH-GERHARZ *et al.*, 1998). Os métodos convencionais para o tratamento da psoríase hoje incluem: a administração sistêmica e tópica de antiinflamatórios, antiproliferativos, imunossupressores e agentes biológicos, bem como o uso de fototerapia. No entanto, estes tratamentos promovem diversos efeitos colaterais importantes, seja o tratamento administrado sistemicamente ou topicamente. Por exemplo: ciclosporina A tem sido relatado como um eficaz tratamento da psoríase (MUELLER e HERRMANN, 1979; GRIFFITHS *et al.*, 1986), mas apresenta uma série de efeitos adversos, como doenças renais, hipertensão ou hiperplasia gengival (KIRBY e ROGERS, 2000; MARKHAM *et al.*, 2002; V'LCKOVA-LASKOSKA, 2005). Os glucocorticóides também são freqüentemente usados no tratamento da psoríase, mas pode produzir efeitos colaterais graves. Os tratamentos tópicos com betametasona e clobetasol podem induzir atrofia da pele, disfunção da permeabilidade de barreira, bem como um aumento de infecções cutâneas (KOLBE *et al.*, 2001; AHN *et al.*, 2006; KRAGBALLE *et al.*, 2006; KUMARAN *et al.*, 2006). São relatados danos hepáticos proveniente de um longo período de administração sistemática do metotrexato (TILLING *et al.*, 2006). Além disso, o metotrexato causa diminuição da densidade óssea (MINAUR *et al.*, 2002).

A seqüência exata dos acontecimentos, bem como os mediadores moleculares que levam a respostas de hiperproliferação na psoríase ainda são desconhecidos (KRISCHEL *et al.*, 1998; FRANK *et al.*, 2000). Contudo o NO tem sido considerado como um forte candidato na patogênese da psoríase por ser um potente regulador de crescimento e diferenciação de queratinócito, como já mencionado anteriormente (KOLB-BACHOFEN *et al.*, 1994; BRUCH-GERHARZ *et al.*, 1996; SIRSJO *et al.*, 1996). Desta forma, podemos sugerir que o NO produzido

pela NOS na pele de camundongos, especialmente a isoforma induzível (NOS2), possui um papel regulatório no processo de hiperproliferação dos queratinócitos, podendo assim as isoformas de NOS serem, provavelmente, um novo alvo para o tratamento de doenças hiperproliferativas de pele.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que:

- ❖ O NO tem participação importante na formação do edema durante o processo inflamatório crônico na orelha de camundongos.
- ❖ A inibição das enzimas NOS reduz significativamente o aumento na espessura da epiderme de orelhas, enquanto, uma quantidade maior de NO proporciona aumento da espessura epidérmica.
- ❖ No modelo de inflamação crônica induzida pelo óleo de cróton, a iNOS é responsável pela produção de NO, participando do processo de hiperproliferação epidermal observado no tecido imunomarcado para PCNA.
- ❖ A inibição da enzima iNOS promove aumento na migração de leucócitos polimorfonucleares e mononucleados, enquanto a inibição da nNOS reduziu a migração de monócitos e a adição de NO exógeno proporciona aumento na migração de leucócitos polimorfonucleares.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, K. S.; AGGARWAL, B. B. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1056, p. 218-33, Nov 2005.
- AHN, S. K.; BAK, H. N.; PARK, B. D.; KIM, Y. H.; YOUM, J. K.; CHOI, E. H.; HONG, S. P.; LEE, S. H. Effects of a multilamellar emulsion on glucocorticoid-induced epidermal atrophy and barrier impairment. *J Dermatol*, v. 33, n. 2, p. 80-90, Feb 2006.
- AKCAY, M. N.; OZCAN, O.; GUNDOGDU, C.; AKCAY, G.; BALIK, A.; KOSE, K.; OREN, D. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced burn wounds. *J Trauma*, v. 49, n. 2, p. 327-30, Aug 2000.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, Aug 1 2001.
- ALP, N. J.; MUSSA, S.; KHOO, J.; CAI, S.; GUZIK, T.; JEFFERSON, A.; GOH, N.; ROCKETT, K. A.; CHANNON, K. M. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest*, v. 112, n. 5, p. 725-35, Sep 2003.
- AMADEU, T. P.; COSTA, A. M. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol*, v. 33, n. 7, p. 465-73, Jul 2006.
- ATHAR, M.; AN, K. P.; TANG, X.; MOREL, K. D.; KIM, A. L.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R. Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 195, n. 3, p. 370-8, Mar 15 2004.
- BECHEREL, P. A.; LE GOFF, L.; KTORZA, S.; OUAZ, F.; MENCIA-HUERTA, J. M.; DUGAS, B.; DEBRE, P.; MOSSALAYI, M. D.; AROCK, M. Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur J Immunol*, v. 25, n. 10, p. 2992-5, Oct 1995.
- BENRATH, J.; ZIMMERMANN, M.; GILLARDON, F. Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide on keratinocyte proliferation. *Neurosci Lett*, v. 200, n. 1, p. 17-20, Nov 10 1995.
- BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. *Drug Discov Today*, v. 4, n. 10, p. 472-479, Oct 1999.

- BOISSEL, J. P.; OHLY, D.; BROS, M.; GODTEL-ARMBRUST, U.; FORSTERMANN, U.; FRANK, S. The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*, v. 123, n. 1, p. 132-9, Jul 2004.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, v. 78, n. 3, p. 206-9, Mar 1982.
- BROWN, D. A.; CANNING, M. T.; NAY, S. L.; PENA, A. V.; YAROSH, D. B. Bicyclic monoterpene diols stimulate release of nitric oxide from skin cells, increase microcirculation, and elevate skin temperature. *Nitric Oxide*, v. 15, n. 1, p. 70-6, Aug 2006.
- BROWN, G. L.; CURTSINGER, L. J.; WHITE, M.; MITCHELL, R. O.; PIETSCH, J.; NORDQUIST, R.; VON FRAUNHOFER, A.; SCHULTZ, G. S. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg*, v. 208, n. 6, p. 788-94, Dec 1988.
- BRUCH-GERHARZ, D.; FEHSEL, K.; SUSCHEK, C.; MICHEL, G.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med*, v. 184, n. 5, p. 2007-12, Nov 1 1996.
- BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol*, v. 110, n. 1, p. 1-7, Jan 1998.
- BRUCH-GERHARZ, D.; SCHNORR, O.; SUSCHEK, C.; BECK, K. F.; PFEILSCHIFTER, J.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol*, v. 162, n. 1, p. 203-11, Jan 2003.
- BUCKLE, D. R.; HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discovery Today*, v. 2, n. 8, p. 325-332, Aug 1997.
- CALS-GRIERSON, M. M.; ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*, v. 10, n. 4, p. 179-93, Jun 2004.
- CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 6, n. 4, p. 328-40, Apr 2005.
- CHANG, H. R.; TSAO, D. A.; WANG, S. R.; YU, H. S. Expression of nitric oxide synthases in keratinocytes after UVB irradiation. *Arch Dermatol Res*, v. 295, n. 7, p. 293-6, Dec 2003.
- CHUN, K. S.; CHA, H. H.; SHIN, J. W.; NA, H. K.; PARK, K. K.; CHUNG, W. Y.; SURH, Y. J. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-kappaB. *Carcinogenesis*, v. 25, n. 3, p. 445-54, Mar 2004.

- CORRIVEAU, C. C.; MADARA, P. J.; VAN DERVORT, A. L.; TROPEA, M. M.; WESLEY, R. A.; DANNER, R. L. Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. *J Infect Dis*, v. 177, n. 1, p. 116-26, Jan 1998.
- DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, Mar 1989.
- DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol*, v. 19, n. 5, p. 573-85, Sep-Oct 2001.
- DELATORRE, A.; SCHROEDER, R. A.; PUNZALAN, C.; KUO, P. C. Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol*, v. 162, n. 7, p. 4101-8, Apr 1 1999.
- DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 36, n. 7, p. 1141-6, Jul 2004.
- DIAZ-CAZORLA, M.; PEREZ-SALA, D.; LAMAS, S. Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, v. 10, n. 5, p. 943-52, May 1999.
- FRANK, S.; KAMPFER, H.; PODDA, M.; KAUFMANN, R.; PFEILSCHIFTER, J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J*, v. 346 Pt 3, p. 719-28, Mar 15 2000.
- FRANK, S.; KAMPFER, H.; WETZLER, C.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int*, v. 61, n. 3, p. 882-8, Mar 2002.
- FRANK, S.; STALLMEYER, B.; KAMPFER, H.; KOLB, N.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J*, v. 13, n. 14, p. 2002-14, Nov 1999.
- FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. *The biology of the skin*. New York: Parthenon Pub. Group, 2001.
- FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*, v. 3, n. 3, p. 199-209, Mar 2002.
- GABOURY, J. P.; NIU, X. F.; KUBES, P. Nitric oxide inhibits numerous features of mast cell-induced inflammation. *Circulation*, v. 93, n. 2, p. 318-26, Jan 15 1996.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de Histologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan S.A., 1999.

- GNIADDECKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmacol*, v. 30, n. 5, p. 619-22, May 1998.
- GRIFFITHS, C. E.; POWLES, A. V.; LEONARD, J. N.; FRY, L.; BAKER, B. S.; VALDIMARSSON, H. Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. *Br Med J (Clin Res Ed)*, v. 293, n. 6549, p. 731-2, Sep 20 1986.
- GUZIK, T. J.; ADAMEK-GUZIK, T.; CZERNIAWSKA-MYSIK, A.; DEMBINSKA-KIEC, A. Nitric oxide metabolite levels in children and adult patients with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Allergy*, v. 57, n. 9, p. 856, Sep 2002.
- GUZIK, T. J.; WEST, N. E.; BLACK, E.; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R.; CHANNON, K. M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*, v. 86, n. 9, p. E85-90, May 12 2000.
- HAAKE, A.; SCOTT, G. A.; HOLBROOK, K. A. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the Skin*, 2001.
- HE, G. W.; YANG, C. Q. Hyperkalemia alters endothelium-dependent relaxation through non-nitric oxide and noncyclooxygenase pathway: a mechanism for coronary dysfunction due to cardioplegia. *Ann Thorac Surg*, v. 61, n. 5, p. 1394-9, May 1996.
- HEBA, G.; KRZEMINSKI, T.; PORC, M.; GRZYB, J.; DEMBINSKA-KIEC, A. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 52, n. 1, p. 39-52, Mar 2001.
- HECK, D. E.; LASKIN, D. L.; GARDNER, C. R.; LASKIN, J. D. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J Biol Chem*, v. 267, n. 30, p. 21277-80, Oct 25 1992.
- IGNARRO, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol*, v. 41, n. 4, p. 485-90, Feb 15 1991.
- IGNARRO, L. J. Nitric Oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 503-514, Dec 2002.
- IKEYAMA, K.; FUZIWARA, S.; DENDA, M. Topical application of neuronal nitric oxide synthase inhibitor accelerates cutaneous barrier recovery and prevents epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J Invest Dermatol*, v. 127, n. 7, p. 1713-9, Jul 2007.
- IWAMA, D.; MIYAHARA, S.; TAMURA, H.; MIYAMOTO, K.; HIROSE, F.; YOSHIMURA, N. Lack of inducible nitric oxide synthases attenuates leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. *Br J Ophthalmol*, v. 92, n. 5, p. 694-8, May 2008.

- JACOBS, A. T.; IGNARRO, L. J. Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*, v. 276, n. 51, p. 47950-7, Dec 21 2001.
- JANG, M.; PEZZUTO, J. M. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Lett*, v. 134, n. 1, p. 81-9, Dec 11 1998.
- KAGOURA, M.; MATSUI, C.; TOYODA, M.; MOROHASHI, M. Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in skin cancers. *J Cutan Pathol*, v. 28, n. 9, p. 476-81, Oct 2001.
- KIRBY, B.; ROGERS, S. Gingival hyperplasia in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Clin Exp Dermatol*, v. 25, n. 1, p. 97-8, Jan 2000.
- KOLB-BACHOFEN, V.; FEHSEL, K.; MICHEL, G.; RUZICKA, T. Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. *Lancet*, v. 344, n. 8915, p. 139, Jul 9 1994.
- KOLBE, L.; KLIGMAN, A. M.; SCHREINER, V.; STOUDEMAYER, T. Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin. *Skin Res Technol*, v. 7, n. 2, p. 73-7, May 2001.
- KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, v. 83, n. 11-12, p. 625-9, Dec 2004.
- KRAGBALLE, K.; AUSTAD, J.; BARNES, L.; BIBBY, A.; DE LA BRASSINNE, M.; CAMBAZARD, F.; FLEMING, C.; HEIKKILA, H.; JOLLIFFE, D.; PEYRI, J.; SVENSSON, A.; TOOLE, J.; WOZEL, G. A 52-week randomized safety study of a calcipotriol/betamethasone dipropionate two-compound product (Dovobet/Daivobet/Taclonex) in the treatment of psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol*, v. 154, n. 6, p. 1155-60, Jun 2006.
- KRISCHEL, V.; BRUCH-GERHARZ, D.; SUSCHEK, C.; KRONCKE, K. D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol*, v. 111, n. 2, p. 286-91, Aug 1998.
- KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; SUSCHEK, C.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol*, v. 1, n. 8, p. 1407-20, Aug 2001.
- KUMARAN, M. S.; KAUR, I.; KUMAR, B. Effect of topical calcipotriol, betamethasone dipropionate and their combination in the treatment of localized vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v. 20, n. 3, p. 269-73, Mar 2006.
- LERNER, L. H.; QURESHI, A. A.; REDDY, B. V.; LERNER, E. A. Nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *J Invest Dermatol*, v. 114, n. 1, p. 196-9, Jan 2000.

- LUGNIER, C.; KERAVALIS, T.; ECKLY-MICHEL, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *J Physiol Pharmacol*, v. 50, n. 4, p. 639-52, Dec 1999.
- MA, P.; CUI, X.; WANG, S.; ZHANG, J.; NISHANIAN, E. V.; WANG, W.; WESLEY, R. A.; DANNER, R. L. Nitric oxide post-transcriptionally up-regulates LPS-induced IL-8 expression through p38 MAPK activation. *J Leukoc Biol*, v. 76, n. 1, p. 278-87, Jul 2004.
- MARKHAM, T.; WATSON, A.; ROGERS, S. Adverse effects with long-term cyclosporin for severe psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, v. 27, n. 2, p. 111-4, Mar 2002.
- MASINI, E.; SALVEMINI, D.; PISTELLI, A.; MANNAIONI, P. F.; VANE, J. R. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. *Agents Actions*, v. 33, n. 1-2, p. 61-3, May 1991.
- MCDONALD, L. J.; MURAD, F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 211, n. 1, p. 1-6, Jan 1996.
- MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, C. P.; PASSOS, G. F.; CALIXTO, J. B. Reduced Skin Inflammatory Response in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. *Biochem Pharmacol*, Apr 28 2009.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*, v. 100, n. 9, p. 2146-52, Nov 1 1997.
- MINAUR, N. J.; KOUNALI, D.; VEDI, S.; COMPSTON, J. E.; BERESFORD, J. N.; BHALLA, A. K. Methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. II. In vivo effects on bone mineral density. *Rheumatology (Oxford)*, v. 41, n. 7, p. 741-9, Jul 2002.
- MORITA, H.; SEMMA, M.; HORI, M.; KITANO, Y. Clinical application of nitric oxide synthase inhibitor for atopic dermatitis. *Int J Dermatol*, v. 34, n. 4, p. 294-5, Apr 1995.
- MUELLER, W.; HERRMANN, B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med*, v. 301, n. 10, p. 555, Sep 6 1979.
- MUHL, H.; CHANG, J. H.; HUWILER, A.; BOSMANN, M.; PAULUKAT, J.; NINIC, R.; NOLD, M.; HELLMUTH, M.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide augments release of chemokines from monocytic U937 cells: modulation by anti-inflammatory pathways. *Free Radic Biol Med*, v. 29, n. 10, p. 969-80, Nov 15 2000.
- MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol*, v. 71, n. 9, p. 1331-6, Apr 28 2006.

- NAKAI, K.; FUJII, S.; YAMAMOTO, A.; IGARASHI, J.; KUBOTA, Y.; KOSAKA, H. Effects of high glucose on NO synthesis in human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Dermatol Sci*, v. 31, n. 3, p. 211-8, May 2003.
- NAKAI, K.; KADIISKA, M. B.; JIANG, J. J.; STADLER, K.; MASON, R. P. Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 12, p. 4616-21, Mar 21 2006.
- NORRIS, A. Targeting mast cells. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 13, n. 7, p. 739-41, Jul 2004.
- OKAMOTO, T.; GOHIL, K.; FINKELSTEIN, E. I.; BOVE, P.; AKAIKE, T.; VAN DER VLIET, A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 286, n. 1, p. L198-209, Jan 2004.
- ORMEROD, A. D.; COPELAND, P.; HAY, I.; HUSAIN, A.; EWEN, S. W. The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin. *J Invest Dermatol*, v. 113, n. 3, p. 392-7, Sep 1999.
- PAUNEL, A. N.; DEJAM, A.; THELEN, S.; KIRSCH, M.; HORSTJANN, M.; GHARINI, P.; MURTZ, M.; KELM, M.; DE GROOT, H.; KOLB-BACHOFEN, V.; SUSCHEK, C. V. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radic Biol Med*, v. 38, n. 5, p. 606-15, Mar 1 2005.
- PENG, H. B.; LIBBY, P.; LIAO, J. K. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem*, v. 270, n. 23, p. 14214-9, Jun 9 1995.
- PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. *Inflammation*, v. 21, n. 4, p. 431-42, Aug 1997.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Rang and Dale's Pharmacology*. 6^a. ed. New York: Churchill/Livingstone, 2006.
- RHODES, L. E.; BELGI, G.; PARSLEW, R.; MCLOUGHLIN, L.; CLOUGH, G. F.; FRIEDMANN, P. S. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E2 in combination. *J Invest Dermatol*, v. 117, n. 4, p. 880-5, Oct 2001.
- ROMERO-GRAILLET, C.; ABERDAM, E.; CLEMENT, M.; ORTONNE, J. P.; BALLOTTI, R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest*, v. 99, n. 4, p. 635-42, Feb 15 1997.
- ROWE, A.; FARRELL, A. M.; BUNKER, C. B. Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol*, v. 136, n. 1, p. 18-23, Jan 1997.

- RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. *Micron*, v. 35, n. 3, p. 161-71, 2004.
- SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods Mol Biol*, v. 225, p. 291-303, 2003.
- SAMPAIO, A. L.; RAE, G. A.; HENRIQUES, M. M. Role of endothelins on lymphocyte accumulation in allergic pleurisy. *J Leukoc Biol*, v. 67, n. 2, p. 189-95, Feb 2000.
- SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochem Pharmacol*, v. 58, n. 5, p. 877-9, Sep 1 1999.
- SCHLAAK, J. F.; BUSLAU, M.; JOCHUM, W.; HERMANN, E.; GIRNDT, M.; GALLATI, H.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; FLEISCHER, B. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol*, v. 102, n. 2, p. 145-9, Feb 1994.
- SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium*, v. 13, n. 6-7, p. 427-34, Jun-Jul 1992.
- SCHON, M. P.; RUZICKA, T. Psoriasis: the plot thickens. *Nat Immunol*, v. 2, n. 2, p. 91, Feb 2001.
- SHANLEY, T. P.; ZHAO, B.; MACARIOLA, D. R.; DENENBERG, A.; SALZMAN, A. L.; WARD, P. A. Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse. *Crit Care Med*, v. 30, n. 9, p. 1960-8, Sep 2002.
- SIMPSON, C. S.; MORRIS, B. J. Activation of nuclear factor kappaB by nitric oxide in rat striatal neurones: differential inhibition of the p50 and p65 subunits by dexamethasone. *J Neurochem*, v. 73, n. 1, p. 353-61, Jul 1999.
- SIRSJO, A.; KARLSSON, M.; GIDLOF, A.; ROLLMAN, O.; TORMA, H. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol*, v. 134, n. 4, p. 643-8, Apr 1996.
- SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*, v. 117, n. Pt 5, p. 667-75, Feb 15 2004.
- SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci*, v. 67, n. 5, p. 477-502, Jun 23 2000.
- STALLMEYER, B.; KAMPFER, H.; KOLB, N.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol*, v. 113, n. 6, p. 1090-8, Dec 1999.

- SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H. H.; HAN, S. S.; KEUM, Y. S.; PARK, K. K.; LEE, S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*, v. 480-481, p. 243-68, Sep 1 2001.
- TANIUCHI, S.; KOJIMA, T.; HARA MT, K.; YAMAMOTO, A.; SASAI, M.; TAKAHASHI, H.; KOBAYASHI, Y. Increased serum nitrate levels in infants with atopic dermatitis. *Allergy*, v. 56, n. 7, p. 693-5, Jul 2001.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W.; LIEW, F. Y.; SEVERN, A.; XU, D.; MCSORLEY, S. J.; GARSIDE, P.; PADRON, J.; PHILLIPS, R. S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol*, v. 24, n. 4, p. 980-4, Apr 1994.
- TEIXEIRA, M. M.; WILLIAMS, T. J.; HELLEWELL, P. G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol*, v. 110, n. 4, p. 1515-21, Dec 1993.
- TILLING, L.; TOWNSEND, S.; DAVID, J. Methotrexate and hepatic toxicity in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Clin Drug Investig*, v. 26, n. 2, p. 55-62, 2006.
- V'LCKOVA-LASKOSKA, M. T. Cyclosporin A-induced gingival hyperplasia in psoriasis: review of the literature and case reports. *Acta Dermatovenerol Croat*, v. 13, n. 2, p. 108-13, 2005.
- VALLETTE, G.; TENAUD, I.; BRANKA, J. E.; JARRY, A.; SAINTE-MARIE, I.; DRENO, B.; LABOISSE, C. L. Control of growth and differentiation of normal human epithelial cells through the manipulation of reactive nitrogen species. *Biochem J*, v. 331 (Pt 3), p. 713-7, May 1 1998.
- VAN DERVORT, A. L.; YAN, L.; MADARA, P. J.; COBB, J. P.; WESLEY, R. A.; CORRIVEAU, C. C.; TROPEA, M. M.; DANNER, R. L. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-alpha production by human neutrophils. *J Immunol*, v. 152, n. 8, p. 4102-9, Apr 15 1994.
- WARREN, J. B.; LOI, R. K.; COUGHLAN, M. L. Involvement of nitric oxide synthase in the delayed vasodilator response to ultraviolet light irradiation of rat skin in vivo. *Br J Pharmacol*, v. 109, n. 3, p. 802-6, Jul 1993.
- WERNER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 9, n. 2, p. 153-65, Jun 1998.
- WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci*, v. 58, n. 18, p. 1485-507, 1996.