

*Nitric oxide and bronchial asthma – review*Eduardo Costa¹, Alfeu T. França², José R. Lapa e Silva³

1. Mestre em Imunologia Clínica, coordenador do Ambulatório de Alergia e Imunologia do Serviço de Clínica Médica do HUPE-UERJ.
 2. Professor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFRJ, Disciplina de Imunologia.
 3. Professor Titular de Pneumologia da Faculdade de Medicina da UFRJ, coordenador do Grupo de Pesquisas em Asma do Serviço de Pneumologia do HUCFF-UFRJ.
- Instituições: Ambulatório de Alergia e Imunologia/Serviço de Clínica Médica – Departamento de Medicina Interna – HUPE-FCM/UERJ.
Serviços de Imunologia e Pneumologia – Departamento de Clínica Médica – HUCFF-FM/UFRJ.

Resumo

Objetivos: Rever os conceitos atuais sobre o metabolismo do óxido nítrico e seus derivados, com ênfase na sua participação em mecanismos fisiológicos pulmonares e no processo inflamatório da asma brônquica.

Material e Métodos: Revisão de estudos publicados nos últimos dez anos, em modelos animais e em seres humanos, que abordam a participação do óxido nítrico e seus principais derivados na patogenia do processo inflamatório crônico da árvore brônquica na asma (MEDLINE database).

Resultados: Os autores chamam atenção para o papel do óxido nítrico como efetor em mecanismos fisiológicos como a neurotransmissão em fibras não-adrenérgicas e não-colinérgicas, e no controle do tônus vascular e brônquico em condições normais. Descrevem sua pequena atividade broncodilatadora quando comparada aos beta-agonistas, e destacam seus efeitos atuantes de maneira desfavorável na asma, como vasodilatação com aumento do edema da mucosa brônquica, lesão epitelial e inibição da subpopulação de linfócitos T helper 1. Terminam descrevendo os efeitos dos glicocorticóides sobre sua síntese e metabolismo, e relatam os resultados de seus recentes estudos que demonstraram o efeito inibitório da corticoterapia inalatória sobre a expressão da sintase induzível de óxido nítrico em células inflamatórias obtidas através de indução de escarro em asmáticos.

Conclusão: O óxido nítrico e seus derivados, nitrito e peroxinitrito, são importantes agentes pró-inflamatórios atuantes na asma brônquica. As medidas do óxido nítrico e seus derivados, assim como o estudo da sintase induzível de óxido nítrico, são índices úteis para avaliação da inflamação brônquica e para o

Participação do óxido nítrico na asma brônquica

O reconhecimento da participação do NO em mecanismos fisiológicos de controle do tônus brônquico e vascular pulmonar, assim como a demonstração de concentrações elevadas de NO no ar expirado de asmáticos e da estimulação e modulação da expressão da forma induzível da NOS em diversas células pulmonares humanas por interleucinas e glicocorticóides, respectivamente, sugerem um papel importante do NO e seus derivados na patogenia de doenças pulmonares que cursam com inflamação brônquica como a asma.

Os estudos sobre o NO na asma podem ser divididos nos que investigam-no como potencial agente terapêutico por seus efeitos sobre o tônus brônquico em asmáticos e naqueles que investigam sua produção aumentada como reflexo do processo inflamatório da doença, seja de forma direta, pela medida de NO no ar expirado, seja de forma indireta, através da detecção do aumento de expressão de NOS 2 em material pulmonar através de diferentes técnicas, ou ainda pela medida de derivados mais estáveis do NO como nitrito e nitrato no BAL ou no escarro induzido.

O NO administrado por via inalatória em doses próximas a 100 ppm parece ter um efeito bronco-dilatador discreto, menor que o dos agonistas beta-adrenérgicos, em uma parcela dos pacientes com asma leve, talvez aqueles com menor hiper-responsividade ou inflamação brônquica. Esse efeito também parece ser maior ou mais evidente em grandes vias aéreas.

Hogman *et al*³⁷, administrando NO por via inalatória na dose de 80 ppm a asmáticos, voluntários saudáveis com e sem hiperresponsividade brônquica e portadores de DPOC, e medindo a condutância corrigida das vias aéreas, demonstraram o efeito broncodilatador desta molécula no tônus basal apenas no grupo de asmáticos. Essa bronco-dilatação foi pequena se comparada àquela causada por doses habituais de beta-agonistas, podendo ser essa limitação uma característica própria do efeito do NO sobre o músculo liso brônquico, ou decorrer da dose utilizada, ou ainda do efeito irritativo do nitrito que se forma pela interação do NO com O₂

acompanhamento da resposta terapêutica às drogas antiinflamatórias na asma.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1999; 22(3):83-93 óxido nítrico, asma, inflamação.

Abstract

Objective: *In the last years nitric oxide and its derivatives have been implicated as important effectors of the inflammatory process of airways in bronchial asthma. The aim is to review the current concepts on metabolism and participation of nitric oxide and its derivatives in physiologic mechanisms and diseases, particularly in bronchial asthma.*

Methods: *Search for published works, including animal models and humans, about nitric oxide metabolism and its participation in lung physiology and disease, particularly bronchial asthma, in the last ten years (from MEDLINE database).*

Results: *The authors point out nitric oxide as an important participant in physiologic events such as non-adrenergic and non-cholinergic neurotransmission, and regulation of bronchial tonus and blood flow in normal conditions. They describe its small bronchodilator property if compared with beta-agonists, and also its negative effects in bronchial inflammation of asthma such as vascular leakage in airways, epithelial cytotoxicity and inhibition of T helper 1 lymphocytes. They also describe the effect of glucocorticoids on nitric oxide synthesis and metabolism, and their own recent studies, which had demonstrate the inhibitory effect of inhaled glucocorticoid treatment on inducible nitric oxide synthase in bronchial inflammatory cells obtained by the induced sputum method in asthmatics.*

Conclusion: *Nitric oxide and its derivatives, nitrite and peroxynitrite, are important effectors in the inflammatory process of bronchial asthma. Measurements of these molecules, and also of inducible nitric oxide synthase, are useful indexes of asthmatic inflammation and of therapeutic response to antiinflammatory drugs in asthma.*

Rev. bras. alerg. imunopatol. 1999; 22(3):83-93 nitric oxide, asthma, inflammation.

Introdução

A partir de 1980 foram publicados diversos estudos demonstrando a produção de óxido nítrico (NO) por células de várias espécies de mamíferos. Já no final daquela década, com a identificação do NO como sendo o responsável pela atividade do então chamado fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)¹⁻³, abriu-se um vasto campo de pesquisas na área biomédica, que resultou no reconhecimento do NO

nas vias aéreas, contrabalançando a broncodilatação causada pelo NO.

Kacmarek *et al*³⁸ observaram aumento discreto porém significativo no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF 1) e na capacidade vital (CV) administrando NO na dose de 100 ppm a adultos com asma leve após broncoprovocação com metacolina. O efeito broncodilatador só ocorreu nos asmáticos com maiores valores de PC 20, ou seja, aqueles com menor hiper-responsividade (seis em 13 pacientes), e se manteve após cessada a administração de NO, não ocorrendo qualquer somação de efeito após nova administração. Não houve aumento do fluxo expiratório forçado a 25% da capacidade vital (FEF 25%), sugerindo pouco ou nenhum efeito do NO sobre o tônus de pequenas vias aéreas. Todos os pacientes responderam adequadamente à administração de isoproterenol por via inalatória ao final do estudo.

Existem menos estudos publicados abordando a administração de NO por via inalatória em crianças. Pfeffer *et al*³⁹ não observaram diferença significativa em qualquer dos valores espirométricos medidos antes e após administração de 40 ppm de NO por via inalatória a doze crianças com asma leve. Cabe ressaltar a menor dose administrada e a utilização de drogas antiinflamatórias (cromoglicato dissódico ou glicocorticóides inalados) por quase todos os pacientes estudados (onze em doze), o que pode ter contribuído para os resultados obtidos.

Já a administração por via inalatória de L-NMMA, um inibidor da NOS constitucional, antes da provocação brônquica reduziu a bronco-constricção induzida por bradicinina e por metacolina separadamente em indivíduos com asma leve, efeito este não observado após administração de D-NMMA ou placebo, sugerindo uma ação bronco-protetora do NO em relação à broncoconstricção causada pela bradicinina e pela metacolina em asmáticos⁴⁰.

Vários estudos demonstraram, por técnica de quimioluminescência, aumento do NO no ar expirado de pacientes com asma em comparação com indivíduos normais. Entretanto, a atuação dessa molécula e seus derivados na inflamação brônquica da asma ainda não está definida.

Em um dos primeiros e mais amplos estudos publicados sobre o assunto⁴¹, o NO expirado foi medido em 67 indivíduos saudáveis, 61 pacientes com asma leve sem uso de medicação ou usando apenas beta-agonistas e em 52 asmáticos utilizando dipropionato de beclometasona (DPB) regularmente. O NO expirado foi claramente maior no grupo de asmáticos que não utilizavam glicocorticóides, apesar de terem formas menos graves da doença, enquanto foi semelhante nos outros dois grupos (asmáticos usando glicocorticóides e saudáveis). Em quatro indivíduos saudáveis, foi administrado L-NAME por via inalatória, ocorrendo redução do NO expirado em seguida, demonstrando que sua produção neste grupo decorre da atividade de NOS constitucional. Desde então a medida do NO expirado vem sendo pesquisada como uma forma potencial de monitoramento da inflamação asmática e também do tratamento antiinflamatório da doença.

Yates *et al*⁴² administraram L-NAME, inibidor da forma constitucional da NOS, e aminoguanidina, inibidor específico da forma induzível da enzima, separadamente por via inalatória a

como molécula importante em diversos mecanismos fisiológicos vasculares, neurológicos e imunitários.

Tamanho importância teve a sua identificação, que o NO foi eleito a "molécula do ano" pela revista Science em 1992, e estudos em modelos animais e em seres humanos têm implicado bem como seus derivados como participantes na patogênese de diversas condições mórbidas, em diferentes sistemas do organismo.

Na sepse, o NO parece estar envolvido na gênese da hipotensão arterial e das alterações vasculares pulmonares⁴⁻⁶, na esclerose múltipla pode participar da lesão à mielina e oligodendrócitos⁶, na hipertensão pulmonar, seja primária ou associada a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), estudos sugerem uma redução de atividade da forma constitucional da síntese de NO (NOSc)^{6, 7}.

A diminuição de produção de NO pode alterar a função da malha trabecular resultando em diminuição da drenagem do humor aquoso no glaucoma de ângulo aberto⁸ e na enxaqueca parece estar envolvido na gênese de fenômenos vasomotores, onde o uso de um inibidor da NOSc comparado ao placebo resultou em melhora de sintomas⁹. Em pacientes com hipertensão arterial essencial estudos sugerem diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio, onde a diminuição da produção de NO poderia colaborar para o aumento da pressão arterial sistêmica¹⁰.

Além disso, o NO tem sido estudado como agente terapêutico na síndrome de angústia respiratória do adulto (SARA), na hipertensão pulmonar do recém-nato e na asma brônquica^{6, 11}. Sua participação na patogênese da asma, ainda não esclarecida é o foco principal desta revisão.

Metabolismo do óxido nítrico e seus derivados

Por ser uma molécula extremamente lábil, cuja meia-vida varia de 0,1 a 5 segundos, de acordo com a sua concentração, o pH e com a presença de outras moléculas no meio^{6, 12-14}, o óxido nítrico possui ações diretas, de forma parácrina, em outras células e vários efeitos indiretos, dependentes dos compostos dele derivados.

Os compostos óxi-nitrogenados de importância biológica são encontrados em cinco estados de oxidação, representados por 13 moléculas diferentes, sendo de maior importância no aparelho respiratório o próprio radical óxido nítrico (NO), a menor molécula com atividade biológica conhecida até o momento, e alguns de seus metabólitos como o nítrito (NO₂-), produto da reação do NO com oxigênio molecular (O₂) em fase aquosa, nitrato (NO₃-) e trióxido de

asmáticos e saudáveis e observaram que o L-NAME reduziu a concentração de NO no ar expirado nos dois grupos, enquanto a aminoguanidina só reduziu o NO expirado nos indivíduos asmáticos, demonstrando que a produção aumentada de NO nesse grupo decorre da atividade da NOS induzível (NOS 2).

Os conhecimentos atuais sobre o metabolismo do NO e a indução de sua síntese, sugerem que o seu aumento nas vias aéreas de pacientes asmáticos esteja associado à inflamação crônica induzida e perpetuada pela ação de interleucinas liberadas por células inflamatórias.

Esta ideia foi reforçada ao se observar que em 16 de 25 asmáticos leves que manifestaram queda do VEF1 seis a dez horas após a broncoprovocação com alérgenos, o aumento do NO expirado correlacionou-se temporalmente com a ocorrência dessa reação tardia, não ocorrendo qualquer aumento durante a fase imediata de broncoconstrição em nenhum dos pacientes estudados⁴³. Estes resultados são compatíveis com a indução de expressão de NOS 2 por interleucinas liberadas por células inflamatórias envolvidas na resposta asmática tardia induzida por alérgenos, com consequente produção de grandes quantidades de NO nas vias aéreas.

Em outro estudo, nem a broncoprovocação com metacolina, nem a broncodilatação induzida pelo salbutamol alteraram a concentração de NO expirado em asmáticos leves não usuários de glicocorticóides⁴⁴, sugerindo que estímulos broncoconstritores inespecíficos, ou não alérgicos, não induzem aumento significativo na produção de NO nas vias aéreas destes pacientes. Confirmando observações anteriores, o NO expirado basal neste grupo de pacientes foi maior que em asmáticos em uso de glicocorticóides e indivíduos saudáveis.

Mais recentemente, Nelson *et al*⁴⁵ também demonstraram aumento de NO no ar expirado em crianças asmáticas comparadas com saudáveis. Além disso, observaram que o tratamento com glicocorticóide sistêmico reduziu o NO expirado para níveis ainda superiores aos encontrados nas crianças saudáveis, apesar da resolução total da obstrução brônquica medida pela relação VEF 1/CVF, sugerindo que a medida de NO expirado seja mais sensível que aquele índice de obstrução brônquica como parâmetro de inflamação.

É importante lembrar que o processo inflamatório, seja ele de natureza alérgica ou não, é sempre mediado por células e moléculas pró-inflamatórias, incluindo as diferentes interleucinas. Desta forma o aumento do NO expirado não deve ser uma característica exclusiva da inflamação asmática, já tendo sido observado em outras formas de inflamação brônquica, como em pacientes com bronquiectasias⁴⁶.

Uma questão fundamental quando se discute os resultados de pesquisas sobre o NO no ar expirado diz respeito à origem anatômica da produção deste composto. Dois estudos publicados recentemente trouxeram informações úteis nesse aspecto ao demonstrarem o aumento nas medidas de NO no ar expirado proveniente das vias aéreas inferiores em asmáticos comparados com saudáveis.

Os seios paranasais são local importante de produção de NO nas vias aéreas superiores. Estudo em crianças com sinusite maxilar

dinitrogênio (N_2O_3), formados em pH ácido a partir do nitrito, e peroxinitrito ($ONOO^-$) e ácido peroxinitroso ($OONOH$), formados a partir da reação com o radical superóxido (O_2^-).

Em meio aquoso, o nitrito é estável por várias horas, entretanto, no sangue ele é rapidamente transformado em nitrato. Desta forma a concentração basal de nitrito no sangue é muito baixa, enquanto a de nitrato é cerca de 100 vezes maior⁷.

Através da interação com ferro, o NO participa do mecanismo efetor da ativação da guanilciclase, da nitrosilação de proteínas e tem seus efeitos inibidos ao se ligar ao heme na hemoglobina.

Através da ativação da guanilciclase, o NO aumenta os níveis intra-celulares de guanidina-mono-fosfato cíclico (GMP cíclico), causando redução de cálcio intracelular. Tal fenômeno é responsável por relaxamento de células musculares lisas tanto no sistema vascular como em outros tecidos (músculo liso uterino e intestinal), inibição de aderência e agregação plaquetária e inibição da quimiotaxia de neutrófilos, além da transdução de sinais na neurotransmissão central e periférica, estando incluída aí a broncodilatação mediada por fibras NANC^{6, 15-17}.

Outros efeitos descritos do NO, independentes da ativação de guanilciclase, são a ativação da ciclooxigenase em macrófagos, inibição da síntese proteica por hepatócitos, citotoxicidade por inibição de enzimas mitocondriais atuantes no ciclo de Krebs, e inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) por inibição da ribonucleotídeo-reductase, sendo os dois últimos as prováveis bases da atividade inibitória de macrófagos sobre células tumorais^{6, 10, 17}.

O NO tem alta afinidade pela hemoglobina, cuja ligação se constitui num mecanismo limitador de sua atividade e também causa nitrosilação da mioglobina e outras proteínas que possuem ferro. Esta é, aliás, a causa da coloração rósea conferida por aditivos a base de nitrito utilizados para melhorar o aspecto da carne bovina. Além disso, a inibição de desidrogenases bacterianas também parece contribuir para o efeito preservativo do nitrito sobre esse tipo de alimento¹².

Além da ligação ao heme, a nitrosilação de moléculas que possuem grupos sulfidrila, como glutatíon, cisteína e albumina, pode funcionar como mecanismo de estabilização do NO, permitindo o seu transporte e minimizando seus efeitos diretos assim como os efeitos tóxicos decorrentes de sua interação com o radical superóxido^{10, 12}.

O peroxinitrito, resultado dessa interação, é um potente agente oxidante, pois gera radicais hidroxila

ajuda de mostrar haver diminuição na concentração nasal de NO, provavelmente em consequência de alterações no fluxo sanguíneo nos seios da face. Os níveis retornavam ao normal após antibioticoterapia⁵⁶.

Massaro *et al*⁴⁷ compararam as medidas de NO expirado pela boca e de tubo orotraqueal entre asmáticos e saudáveis encontrando aumento do NO expirado nos asmáticos nas duas situações, sendo as medidas ligeiramente menores nas coletas pelo tubo traqueal em relação às coletas pela boca, o que confirma a produção de NO em vias aéreas superiores, mas também demonstra que esta deve ser pequena, não influenciando a diferença encontrada entre asmáticos e saudáveis.

Kharitonov *et al*⁴⁸ conduziram estudo mais complexo, medindo o pico de NO expirado pela boca contra resistência e ao final da expiração sem resistência, além de colherem o ar na carina e na emergência do brônquio do lobo médio direito durante broncoscopia e também da fossa nasal durante apnéia voluntária em asmáticos e saudáveis. Apesar de obter maior concentração de NO em todas as formas de coleta nos asmáticos em relação aos saudáveis, não encontraram correlação entre os valores obtidos pela coleta nasal com qualquer das duas formas de coleta pela boca, sugerindo que os níveis medidos pela boca não sofrem influência do NO produzido nas vias aéreas superiores. Encontraram correlação positiva entre as medidas pela boca ao final da expiração com as medidas obtidas através de broncoscopia, certamente oriundas das vias aéreas inferiores. Em relação ao aumento do NO mesmo nas coletas nasais em asmáticos, lembra que os pacientes, apesar de estarem assintomáticos na ocasião da coleta, eram atópicos com história de rinite alérgica, o que pode ter contribuído para a maior concentração de NO também na fossa nasal. Outros autores já demonstraram maior concentração de NO no ar expirado em pacientes com rinite alérgica sazonal em atividade sem asma brônquica quando comparados a indivíduos saudáveis⁴⁹.

Ainda em relação à técnica utilizada para a coleta e confirmando os resultados de Kharitonov *et al* citado acima, Robbins *et al*⁵⁰ compararam as concentrações de NO expirado em pacientes com asma e em saudáveis, incluindo fumantes, medidas a partir de coletas do ar expirado após uma manobra lenta de capacidade vital dentro de um bolsa de Tedlar de 5 L colocada antes do medidor (medida do NO médio) e em um tubo conectado diretamente ao medidor (medida do pico de NO), demonstrando que o NO expirado pela boca foi sempre maior em asmáticos que em saudáveis, independente da forma de coleta.

O número de estudos sobre a expressão de NOS 2 (induzível) na asma, publicados até o momento é pequeno. Em um modelo animal de asma ocupacional associada ao trimetilil anidrido (*trimellitic anhydride* – TMA)⁵¹, os autores observaram aumento de expressão de NOS 2 em homogenizados de tecido brônquico obtido por biópsia 15 a 17 horas após broncoprovocação com o TMA em animais previamente sensibilizados, sugerindo a indução da expressão de NOS 2 associada à resposta asmática tardia naquele modelo, assim como já fora sugerido em seres humanos em estudo que mediu o NO no ar expirado, citado anteriormente⁴³.

Em seres humanos apenas uma publicação demonstra a expressão

(OH), atuando como importante efector em mecanismos de destruição de microrganismos patogênicos por macrófagos e neutrófilos, como *Cryptococcus neoformans*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* e *Staphylococcus aureus*¹⁷. Posteriormente também estimula a produção de muco na árvore brônquica¹⁸ e se produzido em grande quantidade, pode causar lesão celular e tecidual nos processos inflamatórios crônicos pela peroxidação de lipídeos e nitrosilação de proteínas^{12, 19}.

Kharitonov *et al*²⁰ mediram o NO no ar expirado em 18 indivíduos nos primeiros dias do surgimento de sistemas compatíveis com infecção aguda de vias superiores e três semanas após, quando já havia desaparecido o quadro clínico. Os autores encontraram níveis altos de NO expirado na fase sintomática e queda dos mesmos na fase de recuperação para níveis semelhantes aos relatados anteriormente para indivíduos saudáveis, sugerindo aumento de produção do NO durante infecção de vias aéreas, provavelmente por indução rápida de sua síntese.

O NO é produzido a partir da ação de três formas conhecidas de enzimas que catalisam a conversão de L-arginina em L-citrulina pela oxidação do nitrogênio guanidínico da primeira, utilizando tetra-hidrobiopterina (BH₄), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) como cofatores, além de NADPH e O₂ como co-substratos ([figura 1](#)).

Usamos a denominação sintase para nomear as enzimas produtoras de NO, visto que a denominação sintetase se refere a enzimas que utilizam a adenosina trifosfato (ATP) ou outros nucleotídeos trifosfatados como fonte de energia nas reações de condensação por elas catalisadas, o que não é o caso das enzimas produtoras de NO²¹.

As formas da sintase de óxido nítrico (NOS) podem ser divididas em constitucional e induzível, ou ainda classificadas como NOS 1 (constitucional), subdividida em 1a, 1b e 1c (de acordo com os cofatores utilizados e com as células que as expressam), NOS 2 (induzível), NOS 3 (constitucional) e ainda NOS 4 (induzível?)⁶, sendo que esta última não está amplamente descrita na literatura. Por isso adotaremos deste ponto em diante a classificação que considera apenas 3 isoformas da enzima, ou seja NOS 1, 2 e 3²² ([tabela 1](#)).

Enquanto as diversas formas de NOS transformam a L-arginina em L-citrulina para produção de NO, a enzima argininosuccinato-sintetase produz L-arginina a partir de L-citrulina, constituindo-se na principal via conhecida de reciclagem para reposição da L-arginina

mais frequente de NOS 2 em células das vias aéreas de asmáticos comparados a saudáveis⁵². Nesse estudo os autores realizaram biópsia da mucosa brônquica através de broncoscopia em 23 asmáticos e 20 controles saudáveis. Através de técnica de imunohistoquímica demonstraram expressão de NOS 2 na mucosa brônquica (principalmente no epitélio) de 22 dos 23 asmáticos contra apenas dois dos 20 controles. Relataram também indução da expressão da enzima após incubação com TNF α em cultura de células do epitélio brônquico obtidas de peças cirúrgicas oriundas de lobectomia de pacientes com neoplasia pulmonar.

Kanazawa *et al*⁵³ relataram o encontro de concentrações elevadas de nitrito e nitrato no sobre-nadante do escarro induzido de asmáticos em comparação com indivíduos saudáveis. Relataram ainda correlação significativa entre estas medidas e índices associados com a intensidade da inflamação brônquica como o percentual de eosinófilos e de células epiteliais descamadas, e também com a gravidade da obstrução brônquica medida pela relação VEF 1/CVF.

Recentemente pudemos demonstrar, através de técnica de imunocitoquímica com anticorpo anti-NOS 2(NOS2), o efeito inibitório do tratamento com dipropionato de beclometasona sobre a expressão da NOS 2 nas células da árvore brônquica de asmáticos, obtidas através da indução do escarro. A expressão da enzima diminuiu significativamente já após trinta dias de tratamento e se manteve durante todo o período do estudo (90 dias). Esse comportamento ocorreu paralelamente à melhora clínica e funcional dos pacientes e também acompanhou a redução da inflamação eosinofílica e da descamação epitelial⁵⁴. Também observamos a maior expressão de NOS 2 nas células inflamatórias e epiteliais dos asmáticos pré-tratamento quando comparados a controles saudáveis⁵⁵. Através da pesquisa da enzima produtora das grandes quantidades de NO associadas ao processo inflamatório, nossos resultados confirmaram os achados daqueles estudos que utilizaram as medidas de NO no ar expirado, ou seja, sua maior produção nas vias aéreas de asmáticos quando comparados a saudáveis, e também demonstram *in vivo* o efeito inibitório da terapêutica tópica antiinflamatória sobre sua produção.

Conclusão

As repetidas demonstrações de aumento de NO no ar expirado de asmáticos, assim como de expressão da NOS 2 em material obtido da árvore brônquica desses pacientes, além dos recentes estudos com escarro induzido citados acima, se não esclarecem o exato papel do NO e seus derivados na inflamação asmática, a despeito de seus efeitos sobre a vasculatura brônquica e sobre células inflamatórias e epiteliais do trato respiratório, ao menos os credenciam como marcadores do processo inflamatório da doença.

Dessa forma, as medidas do NO e seus derivados podem ser úteis como índices de atividade da doença e de monitoramento da resposta ao tratamento antiinflamatório, além de alvos específicos potenciais na terapia da asma brônquica.

Referências bibliográficas

1. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:9265-69.
2. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical

utilizada na formação de NO¹⁷.

As duas formas de sintase constitucional (NOS 1 e 3) são dependentes de cálcio e estimuladas via calmodulina por bradicinina, acetilcolina, histamina, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF). São inibidas por diversos compostos que competem com a L-arginina como substrato da enzima (NG-nitro-L-arginina metilester – L-NAME, NG-monoetil-L-arginina – L-NMMA, NG-nitro-L-arginina- L-NNA e NG-amino-L-arginina-L-NAA), e expressas constitucionalmente em várias células, como fibras nervosas (NOS 1a), células endoteliais (NOS 1b e NOS 3) e neutrófilos (NOS 1c), sendo essa produção basal de NO importante no controle de tônus vascular sistêmico e pulmonar, assim como na transmissão do impulso em neurônios centrais e periféricos^{6, 17, 12, 22, 23}.

A forma induzível da enzima (NOS 2) produz quantidade centenas de vezes maiores de NO que as formas constitucionais, é totalmente ou amplamente independente de cálcio e calmodulina e sua expressão já foi identificada em macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, hepatócitos, células endoteliais, mastócitos, histiócitos e fibroblastos de animais^{17, 22}. A expressão de RNA mensageiro com código genético para NOS induzível é estimulada por IFN γ , lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, TNF α , IL-1 e outras interleucinas^{6, 12, 14, 17, 19, 24}, e inibida por IL-4, IL-8, IL-10, glicocorticóides e aminoguanidina^{10, 19, 22, 24, 28}.

Robbins *et al*²⁵ demonstraram a capacidade de células mononucleares pulmonares obtidas por BAL de indivíduos saudáveis estimularem a produção de NO por células de epitélio brônquico de ratos em cultura, através da indução de expressão de NOS 2 mediada por TNF α e IL-1 β , demonstrando um interessante aspecto da interação entre células monocleares e o epitélio brônquico envolvendo a sintase induzível de NO.

No ser humano a expressão da NOS induzível (NOS 2) foi demonstrada *in vitro* em diversas células²². Kobzik *et al*²³, utilizando técnicas de imunohistoquímica com anticorpo policlonal, identificaram-na em células do epitélio brônquico, endotélio e macrófagos pulmonares, principalmente em áreas de inflamação, em pacientes com pneumopatias diversas. Arruda-Chaves *et al*²⁶ identificaram, pela técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR), RNAm para NOS 2 em eosinófilos humanos purificados.

Mais recentemente Nicholson *et al*²⁷, em estudo que teve a participação de pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar da Universidade Federal do Rio de

- properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research* 1987; 61: 866-79.
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
 4. Stewart TE, Valenza F, Ribeiro SP, Wener AD, Volgyesi G, Mullen JBM *et al*. Increased nitric oxide in exhaled gas as an early marker of lung inflammation in a model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 713-8.
 5. Yachi A, Paterson NAM, McCormack DG. Vascular reactivity in sepsis: importance of controls and role of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 706-12.
 6. Mizutani T, Layton AJ. Clinical applications of nitric oxide. *Chest* 1996; 110: 506-24.
 7. Adnot S, Raffestin B. Pulmonary hypertension: NO therapy? *Thorax* 1996; 51: 762-4.
 8. Grierson I. Glaucoma and nitric oxide. *Lancet* 1996; 347: 1781-2.
 9. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Olensen J. Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet* 1997; 349: 401-2.
 10. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 2002-12.
 11. Warren JB, Higenbottam T. Caution with use of inhaled nitric oxide. *Lancet* 1996; 348: 629-30.
 12. Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airway. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 538-51.
 13. Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1375-80.
 14. Curran AD. The role of nitric oxide in the development of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 111:1-4.
 15. Ellis JL, Udem BJ. Inhibition by 1-N-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airways. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 1543-7.
 16. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48: 1034-43.
 17. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 171-8.
 18. Rochelle LG, Fischer BM, Krunosky TM, Wright DT, Adler KB. Environmental toxins induce intracellular responses of airway epithelium through reactive species of oxygen and nitro-gen. *Chest* 1996; 109(3): 35-9S.
 19. Howarth PH, Redington AE, Springall DR, Martin U, Bloom SR, Polak JM *et al*. Epithelially derived endothelin and nitric oxide in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 228-30.
 20. Kharitonov AS, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995; 8(2): 295-7.
 21. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica* 2ª edição. São Paulo. Sarvier, 1995.
 22. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; 352(4): 351-64.
 23. Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9: 371-7.
 24. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.
 25. Robbins RA, Sisson JH, Springall DR, Nelson KJ, Taylor JA, Mason NA *et al*. Human lung mononuclear cells induce nitric oxide synthase in murine airway epithelial cells in vitro: role of TNF α and IL-1 β . *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 268-73.
 26. Arruda-Chaves E, del Pozo V, de Andrés B, Cár-daba B, Gallardo S, Jurado A *et al*. Expression of mRNA from iNOS on eosinophils (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 139.
 27. Nicholson S, Bonicini-Almeida MG, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie Q, Humford R *et al*. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996; 183: 1-10.
 28. Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today* 1995; 16(3): 128-30.
 29. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax* 1996; 51:218-20.
 30. Flak TA, Goldman WE. Autotoxicity of nitric oxide in airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S202-6.
 31. Nijkamp FP, Folkerts G. Nitric oxide and bronchial hyperresponsiveness. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995; 329(1): 81-96.
 32. Kageyama N, Miura M, Ichinose M, Tomaki M, Ishikawa J, Ohuchi Y *et al*. Role of endogenous nitric oxide in airway microvascular leakage induced by inflammatory mediators. *Eur Respir J* 1997; 10: 13-9.
 33. Gwyn DR, Lindeman KS, Hirshman CA. Inhaled nitric oxide attenuates bronchoconstriction in canine peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 604-9.
 34. Sanna A, Kurtansky A, Veriter C, Stanescu D. Bronchodilator effect of inhaled nitric oxide in healthy men. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1702-4.
 35. Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, Salter M *et al*. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2489-94.
 36. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P *et al*. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur Immunol* 1994; 24: 980-4.
 37. Hogman M, Frostell CG, Hedenstrom H, Hedestien G. Inhalation of nitric

Janeiro, demonstraram aumento da expressão dessa enzima e de RNAm com seu código genético em macrófagos alveolares obtidos por BAL de pacientes com tuberculose pulmonar em comparação com controles saudáveis.

As grandes quantidades de NO produzidas pela forma induzível de NOS, sua ampla distribuição em células inflamatórias, sua modulação por diversas interleucinas e glicocorticóides e sua identificação em áreas de inflamação em tecido humano, sugerem sua participação não apenas em mecanismos de defesa contra patógenos e células tumorais, assim como em condições patológicas de natureza diversa, onde a inflamação esteja presente, incluindo a asma brônquica.

O NO e seus derivados não só participam em mecanismos fisiológicos como estimulação da liberação de insulina por células B pancreáticas, neurotransmissão, citotoxicidade contra patógenos, broncodilatação mediada por fibras nervosas NANC e regulação do tônus e fluxo sanguíneo na vasculatura brônquica (possivelmente participando no controle da relação ventilação/perfusão)^{12, 15, 19, 28, 29}, como também parecem exercer efeitos deletérios quando em quantidades acima das fisiológicas ou em condições de alteração do pH ou dos estados de oxidação, como ocorre em processos inflamatórios, causando toxicidade para células do epitélio brônquico, vasodilatação e edema da parede brônquica e inibição de linfócitos Th 1 com conseqüente amplificação dos efeitos Th 2 dependentes.

Os efeitos do NO e seus derivados sobre o epitélio brônquico não são completamente conhecidos. Rochelle *et al*¹⁸, em artigo de revisão, citam estudos com células epiteliais de traquéia de porcos onde a inibição de NOS 2 reduziu a secreção de mucina estimulada por radicais de oxigênio, histamina, TNF α e PAF, sugerindo um papel regulador do NO na secreção de muco e também na atividade ciliar. Os mesmos autores lembram ainda que a exposição ao dióxido de nitrogênio (NO $_2$) aumenta a permeabilidade do epitélio brônquico, além de contribuir para a ruptura das chamadas *tight junctions*, e aumentar a produção de TNF α , IL-8 e GM-CSF pelo próprio epitélio.

Estudos sobre a infecção por *Bordetella pertussis* em animais mostram que o NO ou seus derivados são os principais efetores da destruição de células do epitélio em grandes vias aéreas. Essa citotoxicidade foi quase totalmente bloqueada por aminoguanidina, um inibidor seletivo da NOS 2³⁰.

Como mencionado anteriormente, acredita-se que o NO exerça um papel fundamental no controle não só do tônus brônquico, mas também do tônus vascular

- oxide modulates adult human bronchial tone. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 147-8.
38. Kacmarek RM, Ripple R, Cockrill BA, Bloch KJ, Zapol WM, Johnson DC. Inhaled nitric oxide - a bronchodilator in mild asthmatics with methacoline-induced bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 128-35.
 39. Pfeffer KD, Ellison G, Robertson D, Day RW. The effect of inhaled nitric oxide in pediatric asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:747-51.
 40. Ricciardolo FLM, Geppetti P, Mistretta A, Nadel JA, Sapienza MA, Bellofiore S et al. Randomized double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in beta $_2$ -agonist-induced asthma. *Lancet* 1996; 348(9024): 374-7.
 41. Kharitonov AS, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994; 343: 133-5.
 42. Yates DH, Kharitonov AS, Thomas PS, Barnes PJ. Endogenous nitric oxide is decreased in asthmatic patients by an inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 247-50.
 43. Kharitonov AS, O'Connor BJ, Evans DJ, Barnes PJ. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1894-9.
 44. Gamier P, Fajac I, Dessanges JF, Dall'ava-San-tucci J, Lockhart A, Dihn Xuan AT. Exhaled nitric oxide during acute changes of airways calibre in asthma. *Eur Respir J* 1996; 9(6): 1134-8.
 45. Nelson BV, Sears S, Woods J, Ling CY, Hunt J, Clapper LM et al. Exhaled nitric oxide as a marker for childhood asthma. *J Pediatr* 1997; 130(3): 423-7.
 46. Kharitonov AS, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair RB et al. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1889-93.
 47. Massaro AF, Mehta S, Lilly CM, Kobzik L, Reilly JJ, Drazen JM. Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1510-4.
 48. Kharitonov AS, Chung KF, Evans D, O'Connor BJ, Barnes PJ. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1773-80.
 49. Martin U, Bryden K, Devoy M, Howarth P. Increased levels of exhaled nitric oxide during nasal and oral breathing in subjects with seasonal rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 768-72.
 50. Robbins RA, Floreani AA, Von Essen SG, Sisson JH, Hill GE, Rubinstein I et al. Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(5): 1631-5.
 51. Yan ZQ, Hansson GK, Skoogh BE, Lötvall JO. Induction of nitric oxide synthase in a model of allergic occupational asthma. *Allergy* 1995; 50: 760-4.
 52. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chan-nes P, Howarth P, Redington A et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993; 342 1510-3.
 53. Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, Fujii T, Kawa-guchi T, Kudoh S et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 624-9.
 54. Costa E. Modulação da Expressão da Sintase Induzível de Óxido Nítrico pelo Glicocorticóide Inalado na Asma Brônquica: Estudo Através do Escarro Induzido. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1998.
 55. Bandeira LW. Óxido Nítrico na Inflamação Brônquica da Asma: Investigação por Escarro Induzido em Asmáticos e Correlação com a Gravidade da Doença. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1998.
 56. Baraldi E, Azzolin NM, Biban P, Zacchello F. Effect of antibiotic therapy on nasal nitric oxide concentration in children with acute sinusitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1680-1683.

Endereço para correspondência

Dr. Eduardo Costa F. Silva
Rua Conde de Bonfim, 297 - S/306 – Tijuca
E-mail : eduardocosta@rj.sol.com.br
20520-051 - Rio de Janeiro - RJ

pulmonar, participando dos mecanismos de controle da relação ventilação/perfusão^{12, 19, 28, 29}, além de contrabalançar a bronco-constricção induzida pela histamina³¹.

Kageyama *et al*³² estudaram os efeitos do pré tratamento com L-NMMA e L-NAME por via intravenosa sobre o extravasamento vascular induzido por substância P, leucotrieno D4 (LTD4) e histamina em um modelo animal, observando inibição dos fenômenos vasculares induzidos pela substância P e LTD 4, principalmente em grandes vias aéreas, efeito esse revertido pela administração de L-arginina. Estes dados sugerem que o NO, no modelo de estudo utilizado, esteja envolvido no mecanismo de aumento da permeabilidade vascular induzido por mediadores como a substância P e LTD 4 na árvore brônquica normal.

O NO administrado por via inalatória parece ter um limitado efeito broncodilatador em pulmões saudáveis. Gwyn *et al*³³, administrando doses variadas de NO através de broncoscopia em cães, diminuíram a broncoconstricção induzida por hipocapnia, acetilcolina e histamina, sugerindo que o NO inalado atenua a resposta constritora das vias aéreas a certos estímulos sem agir sobre o tônus brônquico basal. Sana *et al*³⁴ estudaram o efeito do NO inalado na dose de 80 partículas por milhão (ppm) sobre o tônus brônquico basal e sobre a broncoconstricção induzida por metacolina em voluntários saudáveis, encontrando um efeito broncodilatador discreto (redução de 23% na resistência de vias aéreas) após a provocação com metacolina, e nenhum efeito sobre a resistência basal, estendendo aquelas observações feitas em animais para seres humanos.

Os ensaios terapêuticos com NO inalado em seres humanos têm utilizado doses de 0,1 a 100 ppm, visto que doses maiores estão associadas à ocorrência de edema pulmonar e metahemoglobinemia. Setenta a 80% do NO inalado é transformado em nitrato e parte dele se transforma em nitrito, que pode contribuir para toxicidade neural e carcinogênese¹¹.

Quanto às inter-relações entre linfócitos Th 1 e Th 2 envolvendo o NO e a indução de sua síntese, Liew *et al*³⁵ demonstraram que o pré tratamento de macrófagos peritoneais de ratos com IL-4 (produzida por células Th 2), inibe a produção de NO induzida por IFN-g (um produto de células Th 1) e LPS, assim como sua atividade contra *Leishmania major in vitro*, sugerindo um mecanismo de regulação de células Th 2 sobre células Th 1 que envolve a inibição da indução de NOS 2 e conseqüente redução da produção de NO em macrófagos pela ação da IL-4.

Ainda em relação às sub-populações de linfócitos T, Taylor-Robinson *et al*³⁶, utilizando clones umrinos de

células T, demonstraram que só a po-pulação Th 1, e não a Th 2, é capaz de produzir grandes quantidades de NO após estimulação e que essa produção é decorrente da atividade de NOS induzível, cuja sequência de aminoácidos mostrou-se idêntica à da NOS 2 de macrófagos. Os autores demonstraram ainda que o NO inibiu a produção de IL-2 e IFN g pelas próprias células Th 1, mas não exerceu qualquer efeito na produ-ção de IL-4 por células Th 2.

Outros autores, em diferentes artigos de revi-são, também chamam atenção para a possibilida-de de um efeito supressivo do NO sobre a sub-po-pulação de linfócitos Th 1, contribuindo para a amplificação da resposta Th 2 dependente^{14, 28, 29}.

Além de sugerir um papel relevante do NO na interação entre linfócitos de sub-populações diferentes, os resultados desses estudos sugerem tam-bém uma ação auto-reguladora do NO sobre sua produção por linfócitos Th 1. Se esse mecanismo potencial de auto-regulação for por algum motivo ineficaz no processo inflamatório crônico associa-do às doenças alérgicas, é possível que as grandes quantidades de NO produzidas nestas situações contribuam, pelo menos em parte, para a estimu-lação e/ou perpetuação da resposta imuno-infla-matória Th 2-dependente, característica da maio-ria dos casos de asma brônquica.

A expressão dessa enzima em macrófagos hu-manos foi motivo de controvérsia por muito tem-po. Dois estudos já citados utilizando técnica de imunohistoquímica, demonstraram-na recente-mente em macrófagos pulmonares ativados, obti-dos de peças cirúrgicas de pacientes com neopla-sia pulmonar e em macrófagos de lavado bronco-alveolar de pacientes com tuberculose em ativi-dade^{23, 27}.



Figura 1 – Formação do óxido nítrico (NO) pela sintase de óxido nítrico (NOS)

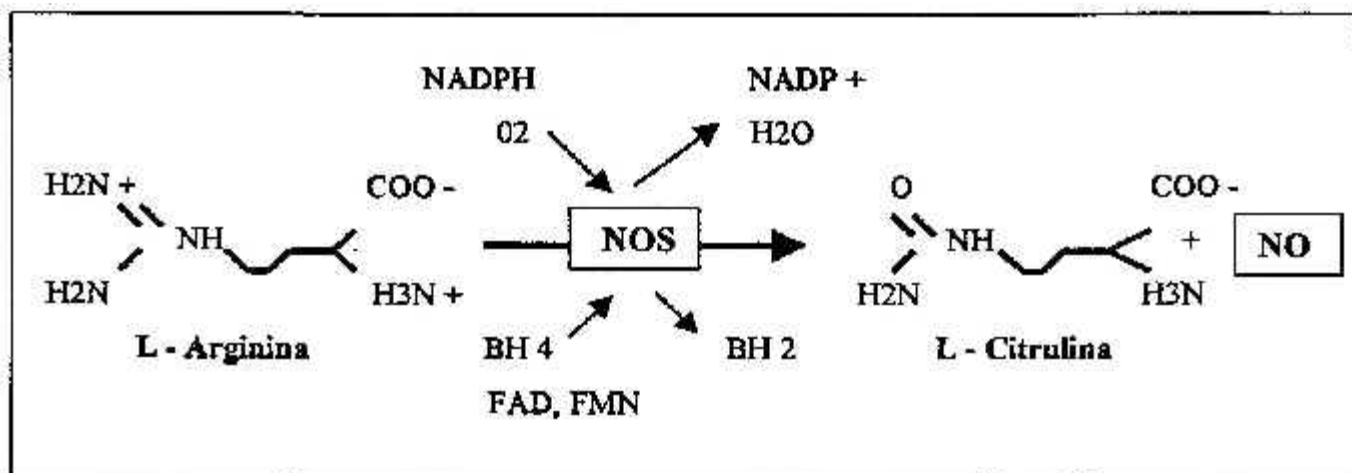


Tabela 1 – Formas da NOS				
Tipo	Ca-Calmodulina	Localização	Ativadores	Inibidores
1 a	dependente	neurônios	bradicinina	L-NAME
b	dependente	cél. endotelial	acetilcolina, LTs	L-NMMA
c	dependente	neutrófilos	histamina, PAF	L-NNA, L-NAA
2	independente	macrófagos, linfócitos epitélio brônquico endotélio, eosinófilos	LPS, IFN g , TNF a IL-1, TNF b , IFN a IFN b	IL-4, IL-8, IL-10 glicocorticóides aminoguanidina
3	dependente	cél. endotelial	= NOS 1	= NOS 1
Modificado a partir de Mizutani e Layon 1996 (6)				

[\[Home Page SBAI\]](#) [\[Índice Geral\]](#) [\[Índice do Fascículo\]](#)

A Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia.
Copyright 1998 - SBAI - Av. Prof. Ascendino Reis, 455 - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 04027-000