

## *Inibição do edema pulmonar em camundongos por bloqueadores das fosfodiesterases*

<sup>1</sup> Ricardo Baumgarten, <sup>2</sup> Eduardo Monguilhott Dalmarco & <sup>2</sup> Cláudio Laurentino Guimarães\*

1. *Graduando em Farmácia, CCS, FURB*

2. *Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, FURB. Rua Antônio da Veiga, 140, 89010-971, Blumenau, SC. Brasil. clg@furb.br*

---

**Resumo:** Fosfodiesterases (PDEs) são enzimas que degradam o AMPc ou GMPc. Há diversos subtipos de fosfodiesterases, entre os quais os subtipos PDE<sub>4</sub> e PDE<sub>5</sub>. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a mediação da fosfodiesterase na lesão pulmonar induzida por ácido olêico em camundongos, um modelo experimental da Síndrome da Angústia Respiratória Aguda. A lesão pulmonar foi induzida através da administração intravenosa de ácido olêico (100mg/kg) e, o edema pulmonar avaliado, indiretamente, pelo extravasamento do corante de Azul de Evans (50mg/kg). O pré-tratamento dos animais com cafeína, aminofilina ou teofilina (1 a 50mg/kg), inibidores não seletivos à PDE, reduziu o edema pulmonar. Porém, o pré-tratamento com sildenafil ou vardenafila, inibidores seletivos da PDE<sub>5</sub>, não reduziram o edema pulmonar. Os resultados obtidos sugerem que a ativação de PDEs, mas não a PDE<sub>5</sub>, medeia o processo inflamatório pulmonar em camundongos submetidos à lesão com ácido olêico.

**Palavras-chave:** ácido olêico, lesão pulmonar, fosfodiesterase, edema pulmonar, camundongo.

---

### 1. Introdução

Fosfodiesterases (PDEs) são hidrolases que degradam nucleotídeos cíclicos intracelulares, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) ou o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), inativando-os<sup>1</sup>. Estas enzimas compreendem uma família de 11 subtipos, encontradas em diferentes células pró-inflamatórias ou estruturais. Inibidores seletivos ou não-seletivos às PDEs induzem diferentes respostas farmacológicas, conforme o extrato celular. Após bloqueio da PDE, a conseqüente elevação dos níveis intracelulares de AMPc induz relaxamento das vias aéreas, elevação da frequência cardíaca e inibição da migração de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, magrófagos) ou inibição da resposta imune. Por sua vez, o aumento dos níveis intracelulares de GMPc, induz vasodilatação. Inibidores não-seletivos para PDEs ainda são úteis à terapêutica como a aminofilina e a teofilina, porém denotam efeitos indesejados significativos<sup>2</sup>. O surgimento de inibidores seletivos aponta para usos específicos em diversas patologias como a asma, hipertensão pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e na disfunção erétil, induzindo menores efeitos indesejados<sup>3,4</sup>.

Na Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA), diferentes mediadores químicos pró-inflamatórios co-participam no processo fisiopatológico. Após lesão da parede endotelial/alveolar há rápido surgimento de edema pulmonar e migração de células pró-inflamatórias<sup>5,6</sup>. A compreensão do processo fisiopatológico da SARA adensa conhecimento para novas intervenções farmacoterapêuticas. A mediação das PDEs no processo fisiopatológico da SARA pode ser alvo farmacológico para o controle terapêutico. Experimentalmente, a lesão pulmonar induzida com ácido olêico em diversas espécies animais denota elevada semelhança fisiopatológica quando comparada à SARA em humanos<sup>7-9</sup>. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do bloqueio da ação enzimática das PDEs sobre o edema pulmonar induzido por ácido olêico em camundongos.

### 2. Material e Métodos

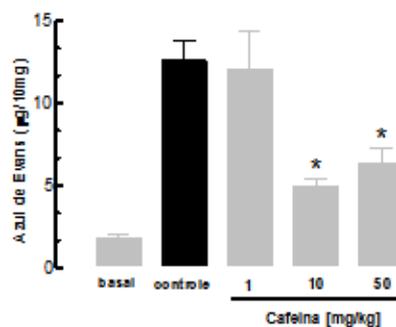
Nos experimentos foram utilizados camundongos Suíços machos (30-35 g), previamente alojados em gaiolas plásticas, temperatura a 25 ± 3° C, ciclos claro/escuro de 12/12 h e com livre acesso à água e ração, até 1 h antes dos experimentos. Todos os protocolos experimentais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética na

Experimentação Animal da Universidade Regional de Blumenau (CEEA protocolo No 015/06). Sob hipnose induzida com éter etílico, cada camundongo recebeu intravenosamente (via intraorbital) 50 mg/kg do corante de azul de Evans (Sigma Chemicals Company, EUA) como marcador do extravasamento de albumina (9). Uma hora após, foram re-anestesiados como descrito anteriormente, e administrou-se intravenosamente (via intraorbital) 100 mg/kg de ácido oléico (em solução de soro-albumina-bovina a 0,1%; Sigma Chemical Company, EUA). Após 1 h, os animais foram eutanasiados (sobre-dose de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, ambas a 300 mg/kg), a cavidade torácica foi exposta e, com o objetivo de extrair-se o excesso de sangue com o corante, os animais foram perfundidos com 10 ml de salina heparinizada (5 UI/ml) aquecida a 37° C. A perfusão foi realizada através da administração da solução por via cardíaca, seguida por secção da veia porta. Logo após, os pulmões foram removidos, separando-os da traquéia e brônquios, pesados e transferidos para estufa a 60° C para secagem por 24 h. As amostras foram deixadas em maceração em formamida (banho-maria a 40° C, 48 h) para a extração do azul de Evans. A leitura da concentração do corante foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm. Curva padrão (1 a 100 µg/ml) de azul de Evans foi utilizada para a interpolação dos dados obtidos em cada amostra. Os resultados (concentração do corante em 10 mg de tecido seco) foram expressos como a média acompanhada do erro padrão da média. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se do teste "t" de Student. Valores de *p* menores do que 0,05 foram considerados significantes.

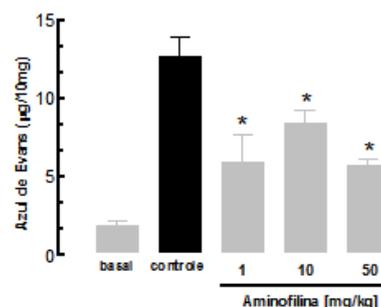
### 3. Resultados

A administração intravenosa de ácido oléico (100 mg/kg) eleva a permeabilidade vascular em mais de 7 vezes ( $12,6 \pm 1,2 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ ), mensurada através do extravasamento de azul de Evans, quando comparado ao grupo basal (sem lesão pulmonar,  $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ ). O pré-tratamento com cafeína, nas doses de 10 ou 50 mg/kg, reduziu significativamente o acúmulo pulmonar de Azul de Evans em  $62,1 \pm 3,4\%$  e  $48,3 \pm 6,4\%$ , respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 1). O pré-tratamento com aminofilina, nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg, reduz significativamente o extravasamento do corante azul de Evans em  $51,7 \pm 13,8\%$ ,  $31,0 \pm 6,9\%$  e  $55,2$

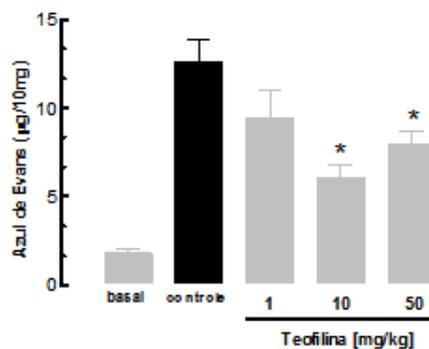
$\pm 3,4\%$ , quando comparado ao grupo controle (Figura 2).



**Figura 1:** Extravasamento de azul de Evans em pulmão de camundongos com (grupo controle e tratados) ou sem lesão pulmonar (grupo basal) induzido com ácido oléico 100 mg/kg). Os animais foram pré-tratados com cafeína nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg. Cada barra demonstra a média + E.P.M. da concentração de azul de Evans em 4 a 8 amostras. Asteriscos denotam  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.



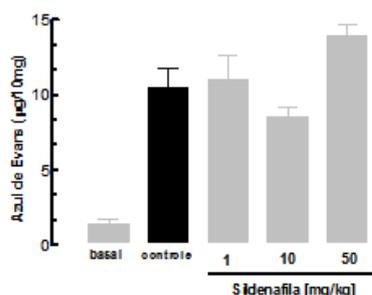
**Figura 2:** Extravasamento de azul de Evans em pulmão de camundongos com (grupo controle e tratados) ou sem lesão pulmonar (grupo basal) induzido com ácido oléico 100 mg/kg). Os animais foram pré-tratados com aminofilina nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg. Cada barra demonstra a média + E.P.M. da concentração de azul de Evans em 4 a 8 experimentos. Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.



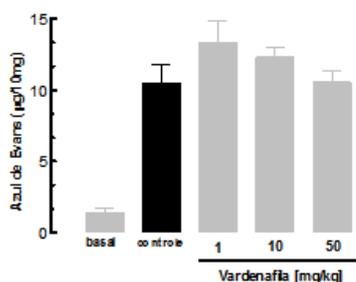
**Figura 3:** Extravasamento de azul de Evans em pulmão de camundongos com (grupo controle e tratados) ou sem lesão pulmonar (grupo basal) induzido com ácido oléico 100 mg/kg). Os animais foram pré-tratados com teofilina nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg. Cada barra demonstra a média + E.P.M. da concentração de azul de Evans em 4 a 8 experimentos. Asteriscos denotam  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

O pré-tratamento com teofilina, nas doses de 10 e 50 mg/kg, reduz o acúmulo de azul de Evans em  $51,7 \pm 6,9$  e  $37,9 \pm 5,0\%$ , respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 3).

O pré-tratamento com sildenafil ou vardenafila, nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg não reduziram o extravasamento de azul de Evans, quando comparado ao grupo controle (figuras 4 e 5, respectivamente).



**Figura 4:** Extravasamento de azul de Evans em pulmão de camundongos com (grupo controle e tratados) ou sem lesão pulmonar (grupo basal) induzido com ácido oléico 100mg/kg). Os animais foram pré-tratados com sildenafil nas doses de 1, 10 e 50mg/kg. Cada barra demonstra a média + E.P.M. da concentração de azul de Evans em 4 a 8 experimentos.



**Figura 5:** Extravasamento de azul de Evans em pulmão de camundongos com (grupo controle e tratados) ou sem lesão pulmonar (grupo basal) induzido com ácido oléico 100mg/kg). Os animais foram pré-tratados com vardenafila nas doses de 1, 10 e 50 mg/kg. Cada barra demonstra a média + E.P.M. da concentração de azul de Evans em 4 a 8 experimentos.

#### 4. Discussão

No presente estudo, a inibição da fosfodiesterase com bloqueadores não seletivos como cafeína, teofilina ou aminofilina, reduzem significativamente o extravasamento do corante de azul de Evans, no pulmão de camundongos lesionado com ácido oléico. Os resultados apontam para possível atividade antiedematogênica pulmonar. Por outro lado, a inibição seletiva da fosfodiesterase, neste caso a PDE<sub>5</sub>, com sildenafil ou vardenafila, não inibe o extravasamento pulmonar. Sugerindo, em parte, o não envolvimento dessa

enzima no processo inflamatório agudo na SARA experimental em camundongos.

São muitas as similaridades entre a lesão pulmonar induzida por ácido oléico e àquela observada em pacientes acometidos com SARA, principalmente a causada por embolia gordurosa<sup>8,10</sup>. Tanto na SARA em humanos como na induzida experimentalmente com ácido oléico, há três fases fisiopatológicas distintas: a exsudativa, a proliferativa e a fibrótica<sup>10</sup>. Estendendo achados preliminares acerca da toxicidade do ácido oléico relatados por JEFFERSON & NECHELES<sup>11</sup>, ASHBAUGH & UZAWA<sup>7</sup> observaram que a administração intravenosa de ácido oléico em cães causa, rapidamente, lesões pulmonares semelhantes às observadas nos primeiros estágios da SARA humana. Na fase exsudativa, os pulmões dos animais demonstram zonas hemorrágicas irregulares, nas quais as arteríolas apresentam-se oclusas com hemácias, em grande parte hemolisadas. Além disso, existem sinais evidentes de edema intersticial e intra-alveolar, trombos, congestão vascular e membrana hialina. Por outro lado, DERKS & JACOBOWITZ-DERKS<sup>12</sup> e MONTANER e colaboradores<sup>13</sup> descreveram que a fase proliferativa da lesão induzida por ácido oléico compreende a infiltração de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos, ao mesmo tempo em que ocorre a resolução do edema intersticial e intra-alveolar e a proliferação dos pneumócitos do tipo II. Já a fase fibrótica caracteriza-se pela proliferação de fibroblastos e o surgimento de fibrose pulmonar<sup>14</sup>.

Os mecanismos iniciais através dos quais o ácido oléico induz aumento da permeabilidade vascular são pouco claros. Porém, uma das hipóteses é que a lesão endotelial vascular ser decorrente da formação de radicais livres, provenientes da degradação do ácido oléico por lipases pulmonares<sup>15-18</sup>. Outro possível mecanismo envolvido com o aumento da permeabilidade vascular pulmonar, causada pela ação do ácido oléico, é a formação de derivados eicosanóides ou do fator agregante plaquetário (PAF). Os eicosanóides (prostaciclina) contribuem, além do aumento da permeabilidade vascular, com a resposta vasoconstritora à hipóxia, recrutamento de neutrófilos (leucotrienoB<sub>4</sub> e troboxanoA<sub>2</sub> - TXA<sub>2</sub>) e agregação plaquetária (TXA<sub>2</sub>)<sup>19</sup>. Corroborando com esses resultados, GUIMARÃES e colaboradores (2000) observaram que o bloqueio da ciclooxigenase pelo meloxicam ou dexametasona, inibe significativamente o extravasamento de azul de Evans em camundongos submetidos à lesão pulmonar com ácido oléico, provavelmente devido à inibição da formação de eicosanóides<sup>9</sup>. Por outro

lado, o PAF desempenha diversas ações potencialmente associadas à lesão pulmonar, como por exemplo, agregação plaquetária, ativação de neutrófilos, indução da vasoconstrição pulmonar e, provavelmente, lesão direta das células endoteliais<sup>20</sup>.

Estudos experimentais demonstram a existência de diversos subtipos de PDEs no trato respiratório tanto de animais quanto em humanos. As PDEs desempenham, devido à hidrólise dos segundos mensageiros intracelulares, AMPc e GMPc, diferentes eventos celulares relacionados nos processos fisiológicos quanto nos patológicos. No pulmão isolado e perfundido de rato, a vasoconstrição e a broncoconstrição induzidas por endotelina-1 são inibidas por motapizona ou rolipram, bloqueadores seletivos para PDE<sub>3</sub> e PDE<sub>4</sub>, respectivamente. O rolipram, mas não a motapizona, também inibe a liberação de TXA<sub>2</sub><sup>21</sup>. A formação do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), outro mediador pró-inflamatório, por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) em monócitos humanos in vitro, é inibido após bloqueio da PDE<sub>4</sub> com rolipram<sup>22</sup>. Em adição, a administração intravenosa de LPS em ratos induz elevação de neutrófilos e citocinas como o TNF $\alpha$  e interleucina-6 no exsudato alveolar. Tanto os neutrófilos como as citocinas foram reduzidas em animais pré-tratados com olprinona, inibidor seletivo da PDE<sub>3</sub>, ou dexametasona<sup>23</sup>. Por outro lado, II-BOSHI e colaboradores<sup>24</sup> demonstraram que em pacientes acometidos com DPOC, os níveis elevados de interleucina-8 e TNF $\alpha$  no escarro são significativamente reduzidos, após tratamento crônico com teofilina. Em ratos, a hipertensão pulmonar induzida com monocrotalina é reduzida após tratamento dos animais com sildenafil, inibidor seletivo da PDE<sub>5</sub><sup>25</sup>.

Estudos acerca do potencial inibitório de drogas na atividade enzimática de subtipos de PDEs demonstram que a teofilina possui maior afinidade de inibição (concentração inibitória 50%: CI50 58  $\mu$ M) à PDE<sub>4</sub>, seguida por PDE<sub>1</sub> (CI50 108  $\mu$ M), PDE<sub>3</sub> (CI50 176  $\mu$ M) e PDE<sub>2</sub> (CI50 220  $\mu$ M)<sup>26</sup>. Porém, o rolipram (CI50 0,6  $\mu$ M), a denbufilina (CI50 0,8  $\mu$ M) e a zardaverina (CI50 1,6  $\mu$ M) superam o potencial inibitório da teofilina, em relação à PDE<sub>4</sub><sup>27</sup>. CARSON & LUE (2005) apontam que a sildenafil e a vardenafilina possuem extrema afinidade de inibição à PDE<sub>5</sub> (CI50 1  $\mu$ M) do que em relação aos subtipos de PDE<sub>4</sub> (PDE<sub>4a</sub>, PDE<sub>4b</sub>, PDE<sub>4c</sub> e PDE<sub>4d</sub>)<sup>28</sup>.

No modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzido por *Escherichia coli*, o pré-trata-

mento de ratos com inibidores de PDE resultou na diminuição significativa do edema pulmonar<sup>29</sup>. Em adição, em camundongos submetidos à lesão pulmonar aguda com lipossacarídeo, o LASSBio596, estruturalmente um híbrido químico da talidomina com sildenafil, reduz significativamente tanto o edema pulmonar quanto a fibroproliferação<sup>30</sup>. Salienta-se que o LASSBio596, inibe tanto a PDE<sub>4</sub> quanto a PDE<sub>5</sub>.

O bloqueio das PDEs, elevando-se os níveis dos segundos mensageiros, reduz o processo inflamatório através do bloqueio da síntese de mediadores do processo inflamatório ou interferindo no processo de migração de células pró-inflamatórias ou, ainda, na hemodinâmica capilar. Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a inibição das PDEs, por bloqueadores não específicos (cafeína, teofilina e aminofilina) interfere, de forma significativa, no extravasamento pulmonar em camundongos submetidos à lesão com ácido oléico.

## 5. Agradecimentos: FAPESC.

## 6. Referências

1. Fan Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533(1-3):110-7.
2. Nakano J, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Ohbayashi O, Yamashita N, Ohta K. Aminophylline suppress the release of chemical mediators in treatment of acute asthma. *Respir Med.* 2006; 100(3):542-50.
3. Soto FJ, Hanania NA. Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2005; 11(2):129-34.
4. Antoniu SA. Roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006; 7(5):412-7.
5. Lesur O, Berthiaume Y, Blaise G, Damas P, Deland E, Guimond JG, Michel RP. Acute Respiratory Distress Syndrome: 30 years later. *Can Respir J.* 1999; 6(1):71-86.
6. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000; 342(18):1334-49.
7. Ashbaugh DG, Uzawa T. Respiratory and hemodynamic changes after injection of free fatty acids. *J Surgical Research.* 1968; 8(9):417-23.
8. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149(1):245-60.
9. Guimarães CL, Da-Silva S, Couture R, Rae, GA. Mixed endothelin ETA and ETB antagonist bosentan inhibits oleic acid-induced lung plasma extravasation in mouse. *J Cardiovasc Pharm.* 2000; 36(Suppl. 1):S371-S373.
10. Tomashefski JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* 2000; 21(3): 435-66.
11. Jefferson NC, Necheles H. Oleic acid toxicity and fat embolism. *Proc Soc Exp Biol.* 1948; 248:50.
12. Derks CM, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid: a systematic morphologic study. *Am J Pathol.* 1977; 87(1): 143-58.

13. Montaner JSG, Tsang J, Evans KG, Mullen JBM, Burns AR, Walker DC et al. Alveolar epithelial damage: a critical difference between high pressure and oleic acid-induced low pressure pulmonary edema. *J Clin Invest.* 1986; 77(6): 1786-96.
14. Johanson WG, Holcomb JR, Coalson JJ. Experimental diffuse alveolar damage in baboons. *Am Ver Respir Dis.* 1982; 126(1): 142-51.
15. Johanson WG, Holcomb JR, Coalson JJ. Experimental diffuse alveolar damage in baboons. *Am Ver Respir Dis.* 1982; 126(1): 142-51.
16. Peltier LF. Fat embolism: a pulmonary disease. *Surgery* 1967; 62(4): 756-8.
17. Townsley MI, Taylor GE, Korthuis RJ, Taylor AE. Promethazine or DPPD pre-treatment attenuates oleic acid-induced injury in isolated canine lungs. *J Appl Physiol.* 1985; 59(1): 39-46.
18. Beilman G. Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. *Lipids* 1995; 30(9): 817-23.
19. Christman BW, Lefferts PL, Blair IA, Snapper JR. Effect of platelet-activating factor receptor antagonism on endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep. *Am Ver Respir Dis* 1990; 142(6 Pt 1): 1272-8.
20. Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voekel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987; 79(5): 1498-107.
21. Held H-D, Wendel A, Uhlig S. Phosphodiesterase inhibitors prevent endothelin-1-induced vasoconstriction, bronchoconstriction, and thromboxane release in perfused rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231(1): 22-5.
22. Seldon PM, Barnes PJ, Giembycz MA. Interleukin-10 does not mediate the inhibitory effect of PDE-4 inhibitors and other cAMP-elevating drugs on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  generation from human peripheral blood monocytes. *Cell Biochem Biophys.* 1998; 29(1-2): 179-201.
23. Koike T, Qutab MN, Tsuchida M, Takekubo M, Saito M, Hayashi J-I. Pretreatment with olprinone hydrochloride, a phosphodiesterase III inhibitor, attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury via an anti-inflammatory effect. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21:166-171.
24. Iiboshi H, Ashitani J-i, Katoh S, Sano A, Matsumoto N, Mukae H et al. Long-term treatment with theophylline reduces neutrophils, interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20(1): 46-51.
25. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz GY, Butrous G, Ermert L et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care med.* 2004; 169(1): 39-4.
26. NICHOLSON C.D., JACKMAN S.A., WILKE R. The ability of denbufylline to inhibit cyclic nucleotide phosphodiesterase and its affinity for adenosine receptors and the adenosine re-uptake site. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 889-897.
27. SHAHID M, van AMSTERDAM R.G., de BOER J, ten BERGE R, et al. The presence of five cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in bovine tracheal smooth muscle and the functional effects of selective inhibitors. *Br J Pharmacol* 1991, 104: 471-477.
28. CARSON C.C. & LUE T. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU International* 2005, 96: 257-280.
29. SPOND, J.; CHAPMAN, J.; FINE, J. et al. Comparison of PDE4 inhibitors, rolapram and SB 207499 (Ariflo) in rat model of pulmonary neutrophilia. *Pulm Pharmacol & Ther* 2001; 14: 157-164.
30. ROCCO, P.R.M, MOMESSO, D.P, FIGUEIRA, R.C. et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J*, 2003; 22: 20-27.