

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM

Avaliação do uso do antagonista dos receptores NMDA (MK-801) como protetor no dano oxidativo em modelo experimental de lesão pulmonar aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Autor

Aline Andrea da Cunha

Orientador

Jarbas Rodrigues de Oliveira

Porto Alegre, RS

Dezembro/ 2007

**“Se não procurares senão a recompensa,
o trabalho vai parecer-te penoso: mas, se
apreciares o trabalho por si mesmo, nele
próprio terás a tua recompensa.”**

(Leon Tolstoi)

Dedicatória

**Aos meus pais, João e Valéria, pela
oportunidade de me ajudarem a realizar e
concretizar este sonho.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir terminar mais esta etapa de minha vida.

A toda minha família, especialmente aos meus pais, por existirem e por serem a base de meus princípios e de minha formação. Amo vocês.

Ao meu namorado Leandro, obrigada por fazer parte deste momento da minha vida. Desculpe por todos os momentos que não pude dar a atenção que merecia. Te amo muito!!

Ao meu orientador Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pelo apoio, generosidade e pelos ensinamentos diários ao longo desses 7 anos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação da PUCRS: Eduardo, Telmo, Roberto, Vasyl, Marcus, Henrique, Robson, Denizar, Márcio, Emerson, Isabel, Luciana, Melissa, Fernanda Bordignon, Vânia, Fernanda, Débora, Shanna, Cristiane e Lidiane. Muito obrigada.

Ao “meu segundo orientador” Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol pela amizade, por suas idéias e sugestões e, principalmente, pela confiança durante o desenvolvimento deste trabalho; e a todos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental da UNESC pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, especialmente ao aluno Márcio Rodrigo Martins.

Aos amigos do Laboratório 32 da Bioquímica da UFRGS, obrigada pela amizade e por me ajudarem na dosagem da atividade da superóxido dismutase, em especial ao mestrando Guilherme Behr.

Um agradecimento muito especial a minha querida amiga Melissa Guerra Simões Pires por estar sempre presente na minha vida; obrigada pela ajuda e pelo carinho. Você é muito especial para mim. Te adoro muito!

A minha amiga Luciana Mello de Oliveira obrigada por toda a ajuda. Adorei conhecer você melhor ao longo deste mestrado.

A minha estagiária Vânia Pauli, por toda a ajuda e empenho na realização deste trabalho. Meu muito obrigada!!

Aos meus amigos e colegas que trabalharam mais diretamente na realização deste projeto: Vânia Pauli, Luciana Mello de Oliveira, Vasyl Saciura e Robson Henrich. Obrigada pela parceria.

À Luisa, meus sinceros agradecimentos por toda a ajuda na aquisição dos ratos na FEPPS, sem sua ajuda a conclusão de meu trabalho teria sido bem mais difícil.

Ao Diretor da Faculdade de Biociências da PUCRS, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Cátia pela paciência e por sua disponibilidade de sempre ajudar, e ao Mauro pela paciência.

À Prof^a. Terezinha Paz Munhoz, da Faculdade de Farmácia da PUCRS, pela disponibilidade e auxílio na parte de hematologia. Agradeço também à Vanessa, funcionária do laboratório.

Ao Prof^o Dr. Carlos Luiz Reichel pela disponibilidade de analisar minhas lâminas histológicas.

À funcionária Raquel, do Laboratório de Histologia, por toda a ajuda na elaboração de minhas lâminas de histologia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Ácido *DL*- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

Ca⁺² - Cálcio

CAT - Catalase

c-NOs - Óxido nítrico sintase constitutiva

Cu/Zn-SOD - Superóxido dismutase que contém cobre/zinco

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EAATs - Transportadores de aminoácidos excitatórios

e-NOs - Óxido nítrico sintase endotelial

ERNs - Espécies reativas do nitrogênio

EROs - Espécies reativas do oxigênio

Fe-SOD - Superóxido dismutase que contém ferro

FiO₂ - Fração inspirada de oxigênio

GR - Glutathione redutase

GSH - Glutathione (forma reduzida)

GSH-PX - Glutathione peroxidase

GSSG - Glutathione (forma oxidada)

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IL-1 - Interleucina 1

IL-8 - Interleucina 8

i-NOs - Óxido nítrico sintase induzível

I.P. - Intraperitoneal

I.T. - Intratraqueal

K^+ - Potássio

Kainato - Ácido 2-carboxi-4-(1-metiletenil)-3-pirrolidinacético

LBA - Lavado broncoalveolar

LDH - Lactato desidrogenase

LPA - Lesão pulmonar aguda

LPO - Lipoperoxidação

MDA - Malondialdeído

Mg^{+2} - Magnésio

mGluR - Receptor glutamatérgico metabotrópico

MK-801 - (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino ou dizocilpina

Mn-SOD - Superóxido dismutase que contém manganês

Na^+ - Sódio

NMDA - Receptor *N*-Metil-D-Aspartato

NMDAR 1 - Receptor NMDA do tipo 1

NMDAR 2A-D - Receptores NMDA do tipo 2 (A-D)

NMDAR 3A-B - Receptores NMDA do tipo 3 (A-B)

n-NOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO - Óxido nítrico

NOs - Óxido nítrico sintase

O_2 - Oxigênio

$O_2^{\cdot -}$ - Radical superóxido

OH^{\cdot} - Radical hidroxil

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

PaO_2 - Pressão parcial de oxigênio arterial

PEEP - Pressão positiva expiratória final

RLs - Radicais livres

RO[•] - Radical lipídico alcóxil

ROOH - Hidroperóxido lipídico

RT-PCR - Reação da cadeia da polimerase com transcriptase reversa

SARA - Síndrome da angústia respiratória aguda

SH - Grupamentos sulfidrila (tióis)

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo inflamatório na LPA (1).....	6
Figura 2: Reação de decomposição do H_2O_2 pela CAT (40).....	9
Figura 3: Dismutação do radical $O_2^{\cdot -}$ por ação da SOD (29).....	10
Figura 4: Reação de decomposição de um hidroperóxido pela GSH-Px (42).....	11
Figura 5 A: Reação de iniciação da LPO (48).....	13
Figura 5 B: Reação de propagação da LPO (48).....	13
Figura 5 C: Reação de terminação da LPO (48).....	13
Figura 6: Representação esquemática do receptor NMDA (62).....	18

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 APRESENTAÇÃO DO TEMA.....	1
1.1 Definição de Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	1
1.1.2 Fisiopatologia da LPA.....	3
1.1.3 Processo Inflamatório na LPA.....	4
1.1.4 Participação de Radicais livres (RLs) e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na LPA	7
1.1.5 Sistema de Defesa Antioxidante contra Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs).....	8
1.1.5.1 Catalase (CAT).....	9
1.1.5.2 Superóxido Dismutase (SOD).....	10
1.1.5.3 Glutathiona Peroxidase (GSH-PX).....	10
1.1.6 Lipoperoxidação na LPA.....	12
1.1.7 Óxido nítrico (NO) e LPA.....	14
1.2 Sistema Glutamatérgico.....	15
1.2.1 Toxicidade dos Receptores NMDA.....	18
1.2.2 Receptor NMDA nos Pulmões e Vias Aéreas.....	20
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 HIPÓTESE	21
2.2 Objetivo Geral	21

2.3 Objetivos Específicos.....	21
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
Abstract	24
Introduction	25
Material and Methods	26
Results	30
Discussion	33
Conclusion	38
References	39
Tables	44
Figures	45
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
5 CONCLUSÕES.....	60
6 PERSPECTIVAS	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8 ANEXO 1 : DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO	74

RESUMO

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome caracterizada por inflamação pulmonar aguda e persistente, com edema pulmonar devido ao aumento da permeabilidade vascular. Na LPA ocorre uma lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar por diferentes mediadores pró-inflamatórios, principalmente, pelas citocinas liberadas em resposta à grande variedade de insultos. A geração de radicais livres (RLs) é outro importante mecanismo de lesão utilizado pelos neutrófilos, que são capazes de gerar muitas das alterações encontradas na LPA. Sabe-se que a produção endógena de glutamato estimula uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo metabólitos do ácido araquidônico, RLs e óxido nítrico (NO). O primeiro relato de que os receptores NMDA poderiam estar envolvidos na fisiopatologia pulmonar ocorreu através da demonstração que o tratamento com um inibidor seletivo desse receptor (MK-801) prevenia o edema pulmonar provocado pelo aumento de NMDA instilado na traquéia de ratos sob ventilação mecânica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do antagonista de receptor NMDA (MK-801) como protetor no dano oxidativo em modelo experimental de LPA. Foram utilizados ratos Wistar, machos. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo 1: Injeção intratraqueal (I.T.) de 1 mL de solução salina (n=6); grupo 2: Indução da LPA através da injeção de LPS intratraqueal (100 µg/100 g de peso corporal) e tratamento com solução salina intraperitoneal (I.P.) após indução da LPA (n=6); grupo 3: Indução da LPA e tratamento com MK-801 (0.3 mg/kg I.P.) após indução da LPA (n=6) e grupo 4: Indução da LPA e tratamento com MK-801 (0.3 mg/kg I.T.) após indução da LPA (n=6). Doze horas após o tratamento, os animais foram anestesiados para a retirada do sangue por punção retro-orbital, coleta do lavado broncoalveolar (LBA) e posteriormente, submetidos à eutanásia por decapitação para coleta do tecido pulmonar. O tratamento com MK-801 promoveu uma diminuição na concentração de proteínas totais, uma diminuição na atividade da lactato desidrogenase (LDH), além de diminuir o número de células inflamatórias no LBA. No tecido pulmonar ocorreu uma diminuição do dano oxidativo avaliado através dos níveis de TBARS e NO, e um aumento nos níveis de antioxidantes como a CAT, SOD, GSH e SH. Também observamos uma melhora do processo inflamatório através da análise histopatológica do tecido pulmonar. Podemos concluir através de nossos resultados que o tratamento com MK-801 promoveu uma melhora do processo inflamatório, uma melhora nos níveis de antioxidantes e uma diminuição do dano oxidativo em ratos com LPA induzida através da injeção intratraqueal de LPS.

PALAVRAS-CHAVE: lesão pulmonar aguda, estresse oxidativo, receptor NMDA e MK-801.

ABSTRACT

Acute Lung Injury (ALI) is a syndrome of acute respiratory failure that results from pulmonary inflammation and acute pulmonary edema caused by the increased permeability of the alveolar-capillary barrier. In ALI, capillary endothelium and alveolar epithelium damage occurs resulting from the release of proinflammatory molecules, mainly cytokines, as a response to systemic insults. Free radical production is another important pathologic mechanism mediated by neutrophils, which are capable of developing several clinical disorders found in ALI. It is well known that endogenous glutamate production stimulates the release of many inflammatory mediators, including arachidonic acid metabolites, free radicals and nitric oxide (NO). The first report describing a possible involvement of NMDA receptors in pulmonary pathophysiology was based on a treatment with a selective inhibitor to this receptor (MK-801) used for the prevention of pulmonary edema caused by the increase of NMDA instilled intratracheally in rats under mechanic ventilation. The aim of this study was to evaluate the use of NMDA receptor antagonist (MK-801) as a protection against the oxidative injury in experimental model of ALI. Adult male Wistar rats were used. The animals were randomly divided into four groups: (1) intratracheal instillation (I.T.) of 1 mL isotonic saline (n=6); (2) ALI induction with intratracheal LPS (100 µg/100 g of body weight) plus treatment with saline administered intraperitoneally (I.P.) after ALI (n=6); (3) ALI induction plus MK-801 (0.3 mg/kg administered I.P.) after ALI (n=6); and (4) ALI induction plus MK-801 (0.3 mg/kg administered I.T.) after ALI (n=6). Twelve hours after the treatment, the animals were anesthetized for blood collection using retroorbital puncture and bronchoalveolar lavage (BAL) was collected as well. After that, the animals were killed by decapitation and lung tissue was collected. The treatment with MK-801 promoted a decrease in the total protein concentration, LDH activity and in the total cell number in BAL. In the lung tissue we verified a decrease of the oxidative injury measured by TBARS and NO levels and an improvement in antioxidant levels such as CAT, SOD, GSH and SH. We also verified an improvement in the inflammatory process as observed by the histopathology analysis of lung tissue. The results obtained in this study let us to conclude that treatment with MK-801 promoted an improvement in the inflammatory process and antioxidant levels, as well as a decrease of the oxidative injury in rats with intratracheal LPS-induced ALI.

KEY-WORDS: acute lung injury, oxidative stress, NMDA receptor and MK-801.

1 APRESENTAÇÃO DO TEMA

1.1 DEFINIÇÃO DE LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA)

A Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) é uma síndrome clínica comum, grave, caracterizada por lesão pulmonar aguda (LPA), que afeta tanto pacientes clínicos quanto cirúrgicos, adultos ou crianças (1). Inicialmente descrita por Ashbaugh e Petty em 1967, sua definição e descrição foram redefinidas desde então para melhor incorporação do espectro clínico da doença, bem como para melhor correlação da definição com a fisiopatologia da síndrome (2).

Em 1994, uma nova definição foi estabelecida pelo *American-European Consensus Conference Committees*, e essa foi amplamente adotada por clínicos e pesquisadores da área na identificação da LPA. Segundo o consenso, a LPA foi conceituada como uma síndrome caracterizada por inflamação pulmonar aguda e persistente, com edema pulmonar devido ao aumento da permeabilidade vascular, associada a três achados clínicos (3,4):

1. Infiltrado radiológico alveolar bilateral;
2. Relação entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) entre 201 e 300 mmHg, independente do valor da pressão positiva expiratória final (PEEP);
3. Ausência de evidência clínica de elevação da pressão atrial esquerda.

A SARA, por sua vez, apresenta definição semelhante à LPA, exceto pela presença de hipoxemia grave, identificando-se uma relação entre

PaO_2/FiO_2 igual ou menor a 200 mmHg, independente do valor PEEP (5). Portanto, considera-se que a SARA representa o estágio mais grave do espectro da LPA.

A probabilidade de um paciente desenvolver LPA aumenta à medida que um ou mais fatores de risco estão presentes. Por essa razão, é de fundamental importância identificar o paciente de risco, pois quanto mais precocemente se intervém na causa de base, melhor será o prognóstico.

Os fatores de risco mais comumente relacionados à LPA são os seguintes:

- **Dano direto:** aspiração, infecção pulmonar difusa (pneumonia), inalação tóxica, contusão pulmonar, embolia gordurosa e toxicidade pelo oxigênio.
- **Dano indireto:** sepse, politraumatismo, politransusão, choque, queimaduras, pancreatite, “*by-pass*” cardiopulmonar, intoxicação exógena, coagulação intravascular disseminada e excesso de fluidos.

Histologicamente, a LPA é caracterizada pela presença de dano alveolar difuso. O padrão da lesão envolve três fases histopatológicas distintas (6):

- **Fase exsudativa:** caracterizada por edema intersticial e alveolar, bem como pela formação de membranas hialinas. Ocorre na primeira semana de evolução do quadro;
- **Fase proliferativa:** caracterizada pela melhora do edema pulmonar, pela proliferação de pneumócitos do tipo II, infiltração intersticial por miofibroblastos e deposição de colágeno;

- **Fase fibrótica:** ocorre em pacientes com doença prolongada, caracterizada por alteração da “arquitetura” pulmonar normal, fibrose difusa e formação de cistos.

É importante salientar que as três fases histológicas da lesão não necessariamente ocorrem em todos os pacientes com LPA (6).

1.1.2 FISIOPATOLOGIA DA LPA

A barreira alvéolo-capilar é formada pelo endotélio vascular e o epitélio alveolar. A fase aguda da LPA é caracterizada pela presença de um exsudato protéico no espaço alveolar, como consequência do aumento na permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (7). O epitélio alveolar é composto por dois tipos de células. As células planas ou os pneumócitos tipo I que recobrem cerca de 90% da área alveolar e são menos suscetíveis a dano. As células cubóides, também chamadas de pneumócitos tipo II, recobrem cerca de 10% da área alveolar e são menos resistentes a danos e, tem como função, a produção de surfactante, participação no transporte de íons, proliferação e diferenciação em pneumócitos tipo I. A perda da integridade epitelial na LPA pode ocasionar diversas consequências. Primeiro, sob condições normais, a barreira epitelial é muito menos permeável que a barreira endotelial, sendo assim, o dano epitelial contribui significativamente para o edema alveolar. Segundo, a perda da integridade epitelial e o dano a pneumócitos tipo II interrompem o transporte normal de fluidos, impedindo, assim, a drenagem do edema alveolar (8,9,10). Terceiro, o dano aos pneumócitos tipo II reduz a produção e o *turnover* de surfactante, promovendo as anormalidades do

surfactante (11,12,13). Quarto, a diminuição da barreira epitelial pode levar pacientes com pneumonia bacteriana ao choque séptico (14). Finalmente, se o dano alveolar for severo, o reparo endotelial desorganizado ou insuficiente pode produzir fibrose (15). Assim, o dano epitelial é fundamental no desenvolvimento e na recuperação da LPA, sendo o grau do dano epitelial alveolar um importante fator prognóstico (16,17,18,19).

Nos estágios precoces da doença, os pacientes acometidos apresentam taquipnéia e hipoxemia progressiva sendo que, em 24 horas, já se observa comprometimento radiológico bilateral e, em 48 horas, o quadro pode progredir para uma hipoxemia grave e refratária com necessidade de ventilação mecânica (3).

Até o momento, o tratamento da LPA tem sido de suporte, com entubação traqueal, ventilação mecânica com pressão positiva e altas concentrações de oxigênio inspirado. Embora essas medidas sejam de grande importância na sobrevivência dos pacientes, estudos mais recentes mostram que a própria ventilação mecânica contribui para o dano pulmonar e, possivelmente, para a disfunção de múltiplos órgãos desses pacientes (20).

A taxa de mortalidade dessa síndrome clínica chega a 40%, sendo que a maioria das mortes ocorre por disfunção de múltiplos órgãos e, apenas uma pequena percentagem, morre propriamente por insuficiência respiratória (21).

1.1.3 PROCESSO INFLAMATÓRIO NA LPA

Admite-se que na LPA ocorre uma lesão do epitélio alveolar e do endotélio capilar por diferentes mediadores pró-inflamatórios, particularmente

pelas citocinas, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 8 (IL-8), liberadas em resposta a uma grande variedade de insultos (lesão pulmonar direta ou indireta). Como consequência, os neutrófilos são atraídos e tornam-se ativados, liberando mediadores inflamatórios, como oxidantes e proteases, que lesam diretamente o epitélio alveolar e o endotélio vascular, propagando o processo inflamatório (22). Além disso, achados recentes demonstram que não apenas a produção de citocinas pró-inflamatórias é importante, mas também o balanço entre mediadores pró e antiinflamatórios (23).

Com a inflamação, as barreiras habitualmente responsáveis por impedir o edema alveolar são perdidas, havendo escape de proteínas do espaço intravascular em direção ao espaço intersticial, promovendo edema intersticial e alveolar. O influxo de líquido com elevada concentração de proteínas para o interior dos alvéolos altera a integridade do surfactante pulmonar, com lesão adicional ao tecido pulmonar e colapso alveolar (24).

As lesões pulmonares que ocorrem na LPA provavelmente se originam da ativação sistêmica dos neutrófilos circulantes, que se aderem ao endotélio vascular dos capilares pulmonares. Os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas do oxigênio (EROs), causando dano ao endotélio e rupturas nos capilares com exsudação para dentro do parênquima pulmonar, que então preenche os espaços alveolares (24).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado a ocorrência de dano mediado por neutrófilos na LPA. Avaliações histológicas obtidas em estágios iniciais da LPA mostram um grande acúmulo de neutrófilos (17,24). Também é possível encontrar um grande número de neutrófilos no lavado broncoalveolar

(LBA) obtidos de pacientes com LPA (16). Na figura 1, podemos analisar o processo inflamatório na LPA através da comparação de um alvéolo normal com um alvéolo com LPA.

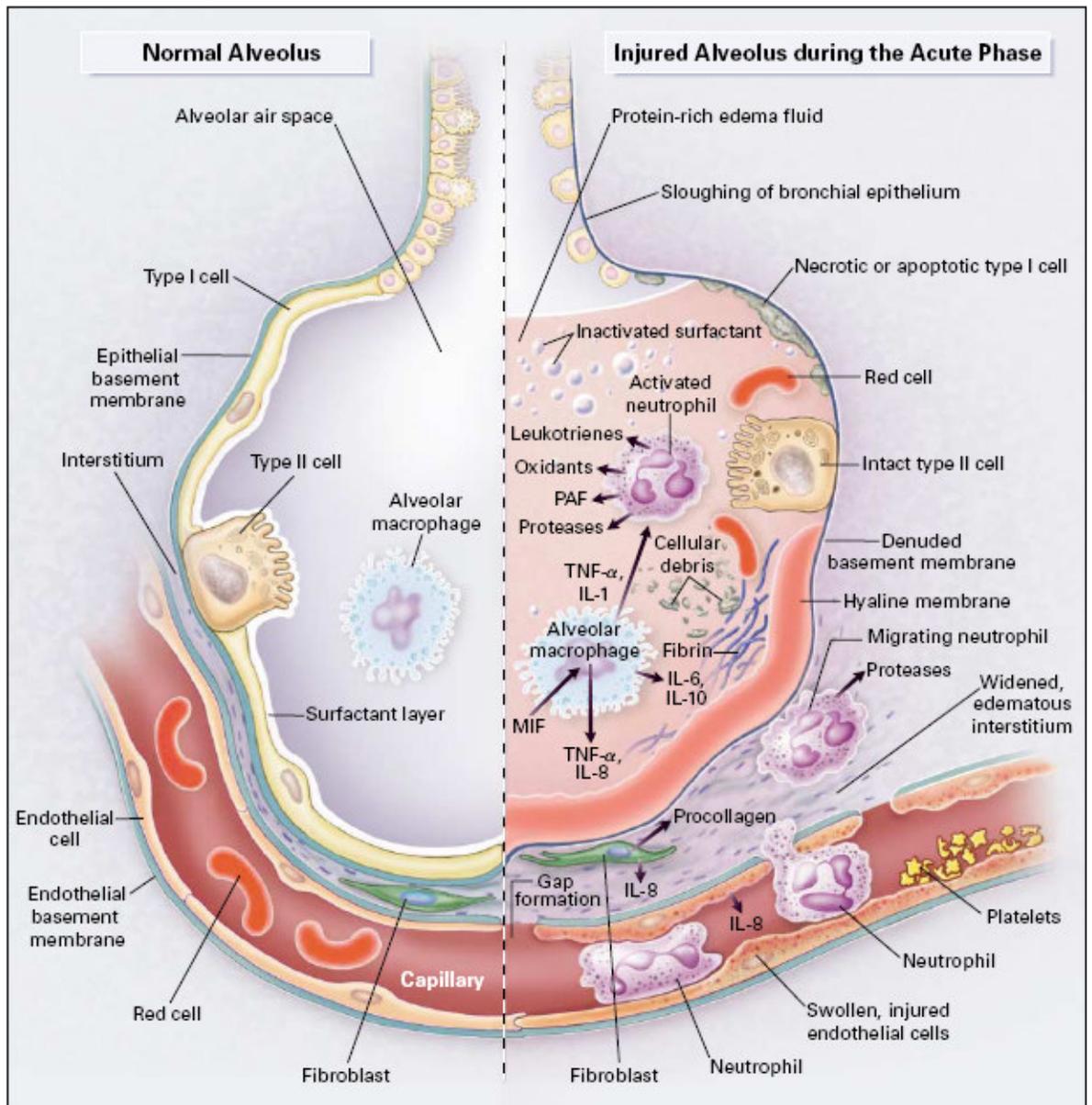


Figura 1. Processo inflamatório na LPA. Alvéolo normal (à esquerda) e alvéolo com LPA (à direita) (1).

1.1.4 PARTICIPAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (RLs) E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) NA LPA

Do ponto de vista químico, um RL é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula capaz de existir sob forma independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (25,26). Portanto, os RLs podem ser formados pela adição ou pela perda de um elétron de uma substância não radical. Entretanto, existem compostos igualmente reativos aos RLs que não possuem um elétron não-pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como RLs (26,27). Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs).

As EROs geralmente têm uma curta duração de vida e sua recombinação química é quase imediata. Estudos demonstram que as EROs possuem uma forte tendência para estabilizar sua órbita externa, para tanto, captam um elétron de outro átomo ou molécula originando uma molécula radicalar (28).

Uma fonte importante de RLs é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial, sendo seu principal sítio de formação o complexo citocromo b-ubiquinona (29,30). Na mitocôndria, a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de oxigênio (O_2) em uma molécula de água (H_2O) e, para isso, são necessários quatro elétrons. Contudo, nem sempre o O_2 origina H_2O diretamente. Como consequência de sua configuração eletrônica, a molécula de O_2 tem forte tendência, durante as reações, de receber um elétron de cada vez, formando uma série de intermediários tóxicos e reativos, tais

como: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila (OH^{\cdot}). O primeiro e o último destes apresentam elétrons desemparelhados e são classificados como RLS. Já o H_2O_2 não tem elétrons não-pareados na última camada e é classificado como uma EROs (31,32).

O $O_2^{\cdot-}$ é o primeiro intermediário formado a partir da redução incompleta do oxigênio molecular na formação da H_2O , e a partir dele podem se formar outras EROs como o OH^{\cdot} e o H_2O_2 (26,33). Muitos sistemas enzimáticos catalisam a redução do O_2 à $O_2^{\cdot-}$. Podemos citar como exemplos: xantina oxidase, flavina oxidase e peroxidases. Várias outras enzimas como aquelas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclooxigenases) e leucotrienos (lipooxigenases) também são fontes de $O_2^{\cdot-}$ (34). Quando os RLS são produzidos em taxas que superam a capacidade antioxidante dos organismos ocasionam uma situação de estresse oxidativo (29,35,36).

A alteração no balanço antioxidante/oxidante parece ser muito importante na fisiopatologia da LPA. Concentrações diminuídas de antioxidantes (ácido úrico, glutathiona, ascorbato) são observadas nas vias aéreas de pacientes com LPA (37). Concentrações elevadas de H_2O_2 bem como de produtos da peroxidação de fosfolipídeos de membrana foram observados no ar exalado por pacientes com LPA (38).

1.1.5 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE CONTRA ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) E ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERNs)

Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo de EROs que incluem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-PX). Essas enzimas evitam o acúmulo de $O_2^{\cdot -}$ e de H_2O_2 e a conseqüente produção de OH^{\cdot} , contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa (26).

Existem substâncias que neutralizam a ação dos RLs, levando à formação de produtos menos tóxicos, denominados “*scavengers*”, enquanto aquelas que atuam absorvendo a energia de excitação dos RLs, neutralizando-os, são chamados “*quenchers*” (34).

1.1.5.1 CATALASE (CAT)

Esta enzima está presente em todos os tipos de células de mamíferos e está localizada, principalmente, num componente subcelular chamado peroxissoma. Alguns órgãos como o coração, músculo esquelético e cérebro contêm níveis mais baixos de CAT do que outros, como o fígado e, assim, estão mais expostos aos danos provocados pelos RLs (39). A atividade catalásica é a principal reguladora dos níveis intracelulares de H_2O_2 (figura 2) (40).

CAT



Figura 2: Reação de decomposição do H_2O_2 pela CAT (40).

1.1.5.2 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A SOD é uma enzima essencial para todas as células aeróbicas, pois catalisa a dismutação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, uma importante EROs, formando H_2O_2 e O_2 . Existem três tipos de SOD, uma que contém cobre e zinco no sítio ativo (Cu/Zn-SOD) e é encontrada no citoplasma em maior quantidade, mas está presente também nos peroxissomas, lisossomas e no espaço intermembranas da mitocôndria; a que contém manganês (Mn-SOD) e está presente na matriz mitocondrial e, a que contém ferro (Fe-SOD) e, é encontrada em plantas e bactérias (29).

Este grupo de enzimas catalisa a reação de dois radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$, com conseqüente formação de H_2O_2 , que é menos reativo e é degradado por outras enzimas (CAT ou GSH-PX) (figura 3). Essa reação pode acontecer espontaneamente em condições fisiológicas, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação é 10^4 vezes maior (29).

SOD

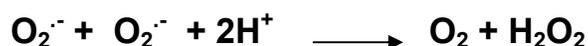


Figura 3: Dismutação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ por ação da SOD (29).

1.1.5.3 GLUTATIONA PEROXIDASE (GSH-PX)

A GSH-PX, quando foi descoberta por Mills em 1957, era considerada uma enzima responsável apenas pela degradação do H₂O₂, tal como a CAT. Hoje, esta enzima, que é encontrada em muitos tecidos animais, é considerada um dos principais sistemas antioxidantes. A enzima reage com uma variedade de hidroperóxidos orgânicos assim como o H₂O₂. Há dois tipos de GSH-Px, uma que utiliza o selênio como cofator, encontrada tanto na mitocôndria como no citosol; e outra que não depende de selênio, encontrada no citosol e responsável pela metabolização de hidroperóxidos orgânicos (41).

A GSH-Px catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutatona reduzida (GSH) para formar glutatona oxidada (GSSG) e o produto de redução do hidroperóxido (figura 4) (42).

GSH-Px



Figura 4: Reação de decomposição de um hidroperóxido pela GSH-Px (42).

A glutatona reduzida (GSH) representa o principal antioxidante não-enzimático hidrossolúvel da célula, provocando seus efeitos desintoxicantes ao reagir com o H₂O₂ e outros peróxidos, transformando-se na sua forma oxidada (GSSG) (43). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidrila (SH) presente na cisteína. A GSH protege a célula contra lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta (44). Após a exposição da GSH ao agente oxidante,

ocorre a oxidação a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima glutathiona redutase (GR), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (45).

O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90% de ratos submetidos à hiperoxia e tratados com instilação de eritrócitos na traquéia. O resultado foi atribuído à GSH intra-eritrocitária, que protegeu o pulmão do dano induzido pelo estresse oxidativo resultante de hiperoxia (46). Além da GSH, existem outros antioxidantes não-enzimáticos importantes, como o ácido ascórbico e o ácido úrico. O ácido úrico é formado pela degradação de purinas e é liberado para o líquido extracelular, que inclui sangue, saliva e líquido de revestimento pulmonar. Juntamente com tióis protéicos, ele é responsável pela principal capacidade de seqüestro de RLs do plasma (47).

1.1.6 LIPOPEROXIDAÇÃO NA LPA

Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Esses lipídios poliinsaturados reagem com as espécies reativas formando hidroperóxidos lipídicos (26). Quimicamente, o processo de lipoperoxidação (LPO) consiste de reações em cadeia e classificadamente são divididas em três fases: reação de iniciação (figura 5 A), reação de propagação (figura 5 B) e reação de terminação (figura 5 C) (26).

Nas reações de iniciação, um RL é formado de uma espécie química não-radical livre estável. Nas reações de propagação, também chamadas de reações centrais, um RL reage com uma molécula estável originando outro RL

como produto e; nas reações de terminação, dois RLs anulam seus elétrons solitários formando um produto estável (48).



A LPO é um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose (26). Por outro lado, este processo pode ser tóxico quando as defesas antioxidantes são insuficientes ou quando há intensa produção de espécies reativas. O ataque das espécies reativas pode oxidar as múltiplas cadeias laterais de ácidos graxos e lipoperóxidos, danificando proteínas de membrana e, assim, afetando vários processos fisiológicos pela alteração da estrutura da membrana, tais como a permeabilidade, fluidez e função (26). A LPO produz aldeídos, gases hidrocarbonados e vários resíduos químicos, como o malondialdeído (MDA), dienos conjugados, entre outros. Assim, a LPO pode ser estimada pela medida de seus produtos e é utilizada para medir indiretamente a produção de RLs (26).

1.1.7 ÓXIDO NÍTRICO (NO) E LPA

Nos estudos sobre LPA, tem sido demonstrada a importância do NO, produzido e liberado pelo endotélio, neutrófilos, macrófagos e plaquetas, participando diretamente da alteração da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar e da lesão pulmonar (49).

A síntese de NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da *L*-arginina, que é convertida em *L*-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOs). Existem diferentes isoformas da NOs: NOs constitutivas (c-NOs), dependentes de íons cálcio e de calmodulina, envolvidas na sinalização celular, e a NOs induzível (i-NOs), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. As isoformas constitutivas compreendem a NOs neuronal (n-NOs), presente normalmente nos neurônios e a NOs endotelial (e-NOs), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (50).

O NO tem sido descrito como uma molécula de dupla função, uma vez que ele pode apresentar tanto um efeito protetor quanto citotóxico. Sob condições fisiológicas, ele age como um importante “*scavenger*” de RLs, inibindo a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos nas células endoteliais, diminuindo o dano da isquemia-reperfusão através da estabilização da membrana celular e, quando produzido por macrófagos, reprimindo e eliminando organismos invasores (51).

Os efeitos citotóxicos do NO resultam, principalmente, da interação com o $O_2^{\cdot -}$ que é formado em grande quantidade durante estados

patológicos, como na LPA e SARA, originando um dos mais potentes e deletérios RL, o peroxinitrito (ONOO^-) (52).

Assim, o NO pode ter um efeito benéfico como uma espécie protetora ou ter um papel pró-oxidante como precursor de ONOO^- (53).

1.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

A manipulação farmacológica da atividade celular é a base do tratamento das doenças. O aminoácido glutamato tem sido extensivamente estudado como um neurotransmissor excitatório. Porém, são consistentes as evidências que seu papel na sinalização celular não está confinado ao sistema nervoso central (SNC), como se acreditava anteriormente, mas se estende a outros tecidos do organismo (54).

Há evidências contundentes sobre a expressão e a função do glutamato como uma molécula de sinalização em diversos sítios do organismo, como ossos, queratinócitos, células β do pâncreas, megacariócitos e seus precursores na medula óssea. Nestes tecidos, são observadas a liberação de vesículas e a resposta celular mediada por receptores, como nas sinapses do SNC (55).

Sabe-se que a produção endógena de glutamato estimula uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo metabólitos do ácido araquidônico, RLs e NO. O sistema glutamatérgico é o maior sistema excitatório do SNC humano. Ele se distribui na maior parte das estruturas do SNC e está envolvido em funções cognitivas fundamentais tais como memória e aprendizado. Alterações do sistema glutamatérgico estão envolvidas em

várias doenças neurológicas como: esquizofrenia, epilepsia, isquemias, doença de Alzheimer, doença de Huntington, transtornos psiquiátricos e transtornos obsessivo-compulsivo e afetivo bipolar (56,57,63).

A sinalização celular glutamatérgica envolve várias fases de atividade. O glutamato é armazenado em vesículas na célula pré-sináptica, estando, assim, pronto para a liberação em resposta a um estímulo. Em seguida, ocorre a exocitose das vesículas e o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica ligando-se a receptores específicos localizados na membrana pós-sináptica. Finalmente, o neurotransmissor é carregado por um transportador e captado pelos astrócitos, promovendo a modulação e reciclagem do neurotransmissor (58).

As ações do glutamato são mediadas por receptores expressos na membrana pós-sináptica, embora existam, também, receptores na membrana pré-sináptica. A expressão de diferentes tipos de receptores permite que um único agonista do glutamato ative vários mecanismos de transdução de sinal. Após a liberação do glutamato e a ativação dos receptores, o neurotransmissor é removido da fenda sináptica carregado por transportadores chamados transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs). Os EAATs mantêm a concentração de glutamato na fenda sináptica, cumprindo um papel importante na intensidade da resposta e na recaptação do neurotransmissor (58).

O sistema glutamatérgico pode ser dividido em dois grupos principais: receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) agem através de segundos mensageiros via ativação da proteína G (57,59). Os receptores ionotrópicos contêm canais iônicos que, quando ativados, permitem a entrada de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{+2})

favorecendo a despolarização do neurônio. Eles são divididos em receptores NMDA (*N*-metil-D-aspartato) e receptores não-NMDA, que, por sua vez, incluem os receptores AMPA (Ácido *DL*- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) e kainato (Ácido 2-carboxi-4-(1-metiletênil)-3-pirrolidinacético) (59).

Os receptores NMDA são canais iônicos formados por diferentes proteínas heteroméricas chamadas subunidades: NMDAR 1 (onde se liga a glicina), NMDAR 2A-D (onde se liga o glutamato) e NMDAR 3A-B. Quando o receptor está em repouso, íons magnésio (Mg^{+2}) ficam ligados a um sítio dentro do canal iônico, impedindo o influxo de cálcio (Ca^{+2}). O canal só é ativado quando três fatores ocorrem simultaneamente: (1) ligação do neurotransmissor glutamato; (2) ligação de glicina (co-agonista obrigatório); e (3) despolarização da membrana pós-sináptica. Estes três fatores provocam uma mudança na conformação alostérica do receptor diminuindo a afinidade pelo Mg^{+2} que é deslocado, permitindo assim o fluxo de íons através do canal iônico (58). Por este motivo a entrada de íons através do canal NMDA é considerada dependente de voltagem (60). A despolarização proporciona liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, incluindo o glutamato e a ativação do receptor NMDA que resulta no influxo de íons Na^{+} e principalmente Ca^{+2} e no efluxo de íons K^{+} (61).

O receptor NMDA é modulado por vários compostos, tanto endógenos quanto exógenos, os quais se ligam em sítios específicos associados a este receptor. Dentre estes, existem sítios de ligação para agonistas e antagonistas, tais como o glutamato/NMDA, sítio onde se liga a dizocilpina (MK-801) e Mg^{+2} (produzindo um bloqueio voltagem-dependente do canal), sítio modulatório para a glicina (co-agonista do receptor NMDA) e zinco, bem como sítio de

ligação para poliaminas (62). Uma representação esquemática do receptor NMDA encontra-se na figura 6.

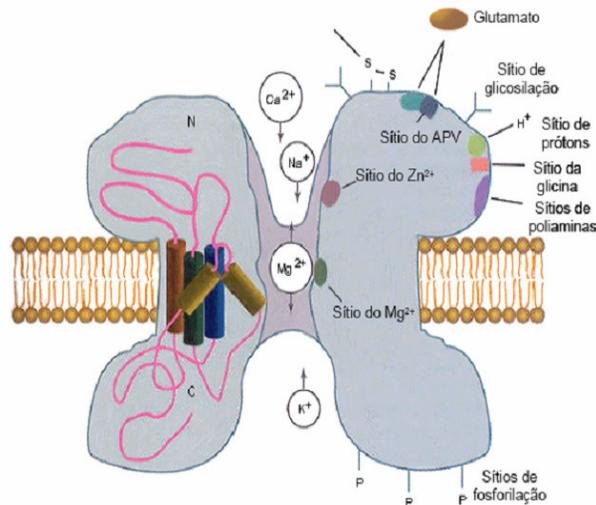


Figura 6: Representação esquemática do receptor NMDA (62).

1.2.1 TOXICIDADE DOS RECEPTORES NMDA

Uma das razões para os efeitos neurotóxicos do receptor NMDA é o fato deste receptor promover a entrada de Ca^{+2} (63,64). O influxo de Ca^{+2} para o interior da célula pode desencadear mecanismos de morte celular, incluindo a ativação de proteínas quinases, fosfolipases, proteases, NOs e RLs (58,65). O aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular por períodos prolongados, ativa cascatas enzimáticas que contribuem para a morte neuronal. As lipases, tais como a fosfolipase A_2 , quando ativadas pelo Ca^{+2} , podem promover a hidrólise de fosfolipídios, causando liberação do ácido araquidônico. O metabolismo do ácido araquidônico pode aumentar a produção de RLs, aumentando a probabilidade de ocorrer peroxidação lipídica (66). As proteases citosólicas e as

nucleases também podem causar danos celulares irreversíveis atacando o citoesqueleto e promovendo uma desorganização da cromatina e fragmentação do DNA (67). A excitotoxicidade do glutamato pode desencadear a morte apoptótica ou necrótica. A morte celular por apoptose envolve a ativação de caspases e proteases dependentes de cisteína. Nesse processo de morte celular não são observadas alterações na permeabilidade celular, as organelas geralmente permanecem intactas e a carga energética da célula é mantida (68). Ao contrário do que é observado durante a apoptose, a morte celular necrótica envolve desequilíbrio na homeostasia da célula, o que leva ao aumento de volume dos compartimentos celulares como a mitocôndria e outras organelas. Estes eventos contribuem para que haja ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular (68).

Sob circunstâncias patológicas envolvendo a excessiva estimulação dos receptores glutamatérgicos, a biossíntese do NO pode ser exacerbada, causando neurotoxicidade através da formação de ERNs. O papel do NO na neurotoxicidade provocada pelo NMDA ainda não está bem esclarecido. Diversos autores descrevem que suas ações associadas com a ação dos RLS contribuem de maneira importante na toxicidade do NMDA (69,70). Ambos podem promover danos em neurônios e em outras células, produzindo uma variedade de ações tóxicas, incluindo danos ao DNA, na transferência de elétrons na cadeia respiratória, bem como a inibição de enzimas mitocondriais importantes (71,74).

1.2.2 RECEPTORES NMDA NOS PULMÕES E VIAS AÉREAS

Pesquisas recentes têm relatado a toxicidade do glutamato sobre células neuronais (excitotoxicidade) e que o uso de antagonistas do receptor NMDA (como o (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino, dizocilpina ou MK-801) teriam um efeito neuroprotetor em diversas situações, por diminuírem a ativação dos receptores glutamatérgicos (72,73).

O primeiro relato demonstrando que o receptor NMDA poderia estar envolvido na fisiologia e fisiopatologia pulmonar ocorreu através da observação que altas concentrações de NMDA instilado na traquéia de ratos, sob ventilação mecânica, induziam um edema pulmonar e, que esse, foi prevenido com o uso de um inibidor seletivo do receptor NMDA (MK-801) (74). Posteriormente demonstrou-se que o uso deste mesmo inibidor do receptor NMDA atenuava significativamente o dano pulmonar causado por paraquat ou xantina oxidase, sugerindo um provável envolvimento dos receptores NMDA como mediadores da LPA (58,74). O MK-801 é descrito na literatura como um potente inibidor seletivo e não-competitivo do receptor NMDA (75).

Dickman *et al* (2004) demonstraram através de técnicas de biologia molecular a presença de vários subtipos do receptor de glutamato do tipo NMDA no pulmão através de RT-PCR e *Western Blotting*. A expressão dos subtipos NMDAR 1, NMDAR 2D e NMDAR 2C foi verificada em diferentes regiões do tecido pulmonar. Além desse estudo, os autores também demonstraram a expressão do receptor NMDAR 2D em macrófagos alveolares. Entretanto, o significado fisiológico desses receptores no trato respiratório ainda é pouco compreendido (76).

2 OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

O uso de um antagonista do receptor NMDA (MK-801) pode diminuir o dano oxidativo através de um modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de um antagonista do receptor NMDA (MK-801) como protetor no dano oxidativo em modelo experimental da LPA em ratos.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1 Avaliar no LBA a contagem total e diferencial de células, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) e a concentração de proteínas totais nos diferentes grupos experimentais;

2.3.2 Avaliar e comparar o dano oxidativo no soro e no tecido pulmonar através da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e determinar os níveis de óxido nítrico (NO) nos diferentes grupos experimentais;

2.3.3 Avaliar e comparar as defesas antioxidantes no sangue através da determinação de alguns parâmetros como: ácido úrico, catalase (CAT), glutathiona reduzida (GSH) e grupamentos sulfidril (SH) nos diferentes grupos experimentais;

2.3.4 Avaliar e comparar as defesas antioxidantes no tecido pulmonar através da determinação de alguns parâmetros como: ferro, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona reduzida (GSH) e grupamentos sulfidril (SH) nos diferentes grupos experimentais;

2.3.5 Realizar a análise histopatológica do tecido pulmonar nos diferentes grupos experimentais.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Treatment with NMDA receptor antagonist (MK-801) protects against oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat

Aline Andrea da Cunha^{1*}, Vânia Pauli¹, Luciana Mello de Oliveira¹, Vasyi Custódio Saciura¹, Robson Henrich Amaral¹, Melissa Guerra Simões Pires¹, Felipe Dal-Pizzol², José Cláudio Fonseca Moreira³, Guilherme Antonio Behr³, Carlos Luiz Reichel⁴, Jarbas Rodrigues de Oliveira¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Laboratório de Fisiologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil

³ Centro de Estudo em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Laboratório Central de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author: Aline Andrea da Cunha. Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Ipiranga Avenue, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: alineacunha@hotmail.com

Tel: +55-51-33203500/ Ext. 4147

Fax: +55-51-33203568

ABSTRACT

Objectives: Acute lung injury (ALI) and the acute respiratory distress syndrome (ARDS) are common clinical syndromes that affect both medical and surgical patients. This study describes the effects of a potent and specific NMDA receptor antagonist (MK-801) against oxidative stress in acute lung injury induced by intratracheal lipopolysaccharide (LPS) injection.

Design: Prospective, randomized, controlled experiment.

Setting: Animal basic science laboratory.

Subjects: Male Wistar rats.

Interventions: The animals were randomly divided into four groups: group 1, control with instillation of isotonic saline (n=6); group 2, lipopolysaccharide (100 µg/100 g of body weight) treated with saline (n=6); group 3, lipopolysaccharide treated with MK-801 (0.3 mg/kg, intraperitoneally; n=6); group 4, lipopolysaccharide treated with MK-801 (0.3 mg/kg intratracheally; n=6).

Measurements and Results: Twelve hours after lipopolysaccharide instillation, the rats were anesthetized and a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed to determine the degree of the alveolar-capillary membrane compromise and inflammatory infiltration. Samples of blood and lung were isolated and assayed for oxidative stress variables and histopathologic analysis. The use of MK-801 decreased bronchoalveolar lavage fluid protein, LDH activity, inflammatory cells, besides the treatment with MK-801 significantly attenuated lung oxidative damage, and histopathologic alterations after lipopolysaccharide instillation.

Conclusion: Our data provide the first experimental demonstration in which MK-801 decreases oxidative stress and limits inflammatory response and alveolar disarray in lipopolysaccharide-induced acute lung injury.

Key Words: acute lung injury; oxidative stress; NMDA receptor; MK-801.

INTRODUCTION

Acute lung injury (ALI) and the acute respiratory distress syndrome (ARDS) are common clinical syndromes that affects both medical and surgical patients. ALI is associated with a wide variety of precipitating factors, which do not normally involve directly the lung, but presents an associated mortality of 40-80%. ALI can result from several clinical conditions, such as gastric aspiration, polytrauma, pancreatitis, hemorrhagic shock, severe burns, oxygen toxicity and surgery involving cardiopulmonary bypass (1). The acute or exudative phase is manifested by the rapid onset of respiratory failure in patients with a risk factor. Pathological findings include diffuse alveolar damage with neutrophils, macrophages, erythrocytes, hyaline membranes and protein-rich edema fluid in the alveolar space (2,3).

The reactive oxygen species (ROs) that have biological importance include superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\cdot}). Reactive nitrogen species (RNs) and derivatives of nitric oxide (NO), including peroxynitrate ($ONOO^-$), have also been implicated in oxidation (nitration) of proteins and lipids (4). ROs and RNs can lead to cell injury by various mechanisms, including: direct damage to DNA; lipid peroxidation with vasoactive and proinflammatory molecules formation such as thromboxane; and oxidation of protein (primarily at sulfhydryl groups) that alter protein activity (5,6).

Abnormally intense exposure to glutamate can be neurotoxic, primarily though to an overactivation of *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA), a phenomenon

known as excitotoxicity (7). This lethal action is exerted in part by the activation of NMDA receptor resulting in an influx of intracellular calcium, which triggers a series of toxic events, ultimately leading to cell death (8). The influx of Ca^{+2} into the cell may lead to cell death by several mechanisms, including the activation of protein kinases, phospholipases, proteases and nitric oxide synthase (NOs), and the generation of ROs (9). The presence of NMDA-type glutamate receptors has been reported in non-neuronal tissue, including pancreatic B cells, kidney, lung, lymphocytes and megakaryocytes (10,11).

Thus, the present study was designed to evaluate the effects of MK-801 on LPS-induced ALI in rat model by intratracheal injection, based on the measurement of blood, lung and alveolar fluid parameters of oxidative stress, antioxidant enzyme activities, parameters of disruption of the alveolar-capillary barrier and lung histopathologic alterations.

MATERIAL AND METHODS

Animals

This study was performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval by Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-1176/07).

ALI (Acute lung Injury) model

Adult male Wistar rats weighting approximately 250-300 g were used in this study. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), given intraperitoneally, and ALI was induced by

intratracheal instillation of LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma Chemical, St. Louis, MO) at a dose of 100 µg/100 g body weight (12).

The animals were randomly divided into four groups: (1) sham-operated, instillation of isotonic saline (n=6 rats); (2) ALI, ALI treatment with saline administered intraperitoneally (n=6 rats); (3) ALI plus MK-801, ALI treated with MK-801 (0.3 mg/kg, administered intraperitoneally; n=6 rats) and (4) ALI plus MK-801, ALI treated with MK-801 (0.3 mg/kg, administered intratracheally; n=6 rats) (12).

Twelve hours after LPS instillation, the rats were anesthetized with a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed. BAL fluid (BALF) was collected three times after instillation and withdrawn with 5 mL of phosphate-buffered saline. We always retrieved approximately 15 mL of BAL administered. The BAL fluid (BALF) was centrifuged (1000 g for 10 minutes), and the resultant cell-free supernatant was analyzed for various biochemical parameters (see below). The cell pellet was used to determine the total and differential cell count (see below). To estimate the degree of alveolar cell injury and alveolar-capillary membrane compromise, BALF protein and lactate dehydrogenase (LDH) content were determined. BALF cells, stained with *thoma*, were evaluated in a *Neubauer* chamber, and cell differentiation was performed on cytocentrifuge slides with *Giemsa*. BALF total protein content was determined by biureto assay (Labtest Diagnóstica[®], Brazil) and the BALF total LDH content was determined by commercially available kits (Labtest Diagnóstica[®], Brazil).

In a separated cohort of animals, ALI was induced as described previously to isolate blood and lung tissue. Twelve hours after LPS instillation,

the rats were killed by decapitation and blood samples and lung tissue were retrieved. The lung was isolated and fixed in 4% formalin solution for histopathologic analysis (see below), and the other samples of lung were isolated and tissue homogenates were immediately stored at -70°C until assayed for oxidative stress. Blood collected with EDTA was centrifuged (1000 g for 5 minutes) and the plasma obtained was immediately stored at -70 °C until assayed for oxidative stress.

Oxidative stress variables and nitric oxide levels

The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, as previously described, was used as an index for oxidative stress in plasma and lung tissue (13). Furthermore, nitric oxide (NO) was determined from lung tissue and plasma. The principle of this assay was the reduction of nitrate by copper-cadmium alloy, followed by color development with Griess reagent (sulfanilamide and *N*-naphthylethylenediamine) in acidic medium. The absorbance was measured at 540 nm (14).

Antioxidant defenses variables

To determine the antioxidant defenses, we measured the activity of the major enzymatic defenses in lung tissues and blood (catalase, superoxide dismutase, reduced glutathione). Catalase (CAT) activity was measured by the decrease rate in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm (15). Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (16). Reduced glutathione (GSH) was measured based on the reaction with dithionitrobenzoic acid as previously

described (17). In addition, we determined the oxidative damage to proteins in lung tissue and plasma through the measurement of plasma sulphhydryl (SH), as previously described (18). Plasma uric acid content and lung iron levels were determined using commercially available kits (Labtest Diagnóstica[®], Brazil).

Histopathological analysis

The histopathological analysis after fixation was accomplished using excised lung tissues embedded in paraffin and then routinely stained with hematoxylin and eosin. A blinded experienced pathologist performed histopathological analysis and inflammation and alveolar edema were graded as none, moderate or severe.

Statistical analysis

The results are expressed as means \pm SEM in all figures. Multiple group comparisons were performed through ANOVA followed by *post hoc* LSD, using the statistical package SPSS 13.0 for Windows. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Antioxidant activity in blood after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

The uric acid concentration, a non-enzymatic antioxidant present in large amounts in the plasma, did not demonstrate statistically significant differences among the studied groups (Table 1). When we analyzed the CAT enzyme based on erythrocytes, it was verified no statistically significant differences among the experimental groups (Table 1). The GSH concentration based on erythrocytes did also not demonstrate statistically significant differences in the different experimental groups (Table 1). The SH plasmatic levels in the MK-801 group treated intratracheally demonstrated a statistically significant increase of their levels when compared to the sham, LPS and LPS groups treated with MK-801 administered intraperitoneally (Table 1).

Oxidative stress variables and nitric oxide levels in the plasma after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

The analysis of plasma levels of TBARS and NO demonstrated a statistically significant increase in the LPS group when compared to the sham group. Nevertheless, the MK-801 treatments did not demonstrate statistically significant differences among the studied groups (Table 2).

Total and differential cell counts in BALF after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

The total cell count in BAL presented a statistically significant increase at 12 hours after the intratracheal LPS-induced ALI. However, the analysis of the MK-801 administered via intraperitoneally or intratracheally demonstrated a statistically significant decrease in cellular infiltration into the BAL (**Table 3**). In the analysis of differential cell count we could observe a predominance of neutrophil infiltration to the inflammatory site after intratracheal LPS injection when compared to the sham group (**Table 3**).

Biochemical parameters in BALF: total protein and LDH activity after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

The LPS administration caused an increased in the protein concentration. Furthermore, the MK-801 administration via intraperitoneally or intratracheally seemed to be more efficient in decreasing this parameter when compared to the group that received intratracheal LPS injection (**Figure 1**).

Regarding the LDH enzyme activity, it was verified a statistically significant increase in the group with LPS compared to the sham group. The intraperitoneal MK-801 treatment decreased the cellular lesion when compared to the LPS group (**Figure 2**).

Iron tissue levels in the lung after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

We observed a statistically significant decrease in the iron level measurement from pulmonary tissue in the group that received LPS when

compared to the sham group. The MK-801 treatment administered via intraperitoneally and intratracheally demonstrated a statistically significant increase when compared to the group that received only LPS (**Figure 3**).

Antioxidant tissue levels in the lung after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

The CAT activity was decreased in the group that received LPS injection whereas the MK-801 treatment provided a statistically significant increase in the enzyme activity (**Figure 4**). The analysis of the GSH tissue levels demonstrated a statistically significant increase in the group that received the MK-801 treatment injected via intraperitoneally when compared to the LPS group (**Figure 5**).

We observed a statistically significant decrease of the SH levels in the group that received intratracheal LPS injection when compared to the sham group. Also, the intraperitoneal MK-801 treatment promoted a statistically significant increase of the SH levels when compared to the LPS group (**Figure 6**).

The SOD activity in the pulmonary tissue was statistically reduced in the LPS group when compared to the sham group. We verified that the MK-801 treatment promoted a statistically significant improvement in the SOD activity compared to the LPS group (**Figure 7**).

Oxidative stress variables in the lung after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

We observed a statistically significant increase of the TBARS tissue levels in the group that received intratracheal LPS injection when compared to the sham group. In addition, the MK-801 treatment administered via

intraperitoneally or intratracheally was effective on diminishing the oxidative injury promoted by the lipoperoxidation when compared to the LPS group (**Figure 8**). The NO tissue levels accomplished a statistically significant increase in the LPS group when compared to the sham group. On the other hand, MK-801 used intraperitoneally demonstrated a statistically significant decrease when compared to the LPS group (**Figure 9**).

Lung histopathology after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

Lung histopathology after LPS administration revealed alveolar disarray, severe inflammatory cell infiltration, and abundant alveolar exudates (**Figure 10A**). All features indicated the occurrence of ALI in this model. After intraperitoneal MK-801 treatment, only moderate inflammatory infiltration was observed; besides, no alveolar exudates could be seen (**Figure 10B**) when compared to a normal lung histopathology that received only intratracheal saline administration (**Figure 10D**). In contrast, the MK-801 treatment intratracheal there were minimal histopathologic differences between the LPS group (**Figure 10 C**).

DISCUSSION

Intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) is a well-characterized model of acute lung inflammation, leading to alveolar macrophages activation and massive tissue infiltration of neutrophils (19). The stimulated leukocytes secrete increased amounts of ROS, arachidonic acid metabolites and various inflammatory mediators, such as interleukin-1 β (IL-1),

proteases, and tumor necrosis factor (TNF- α) (20). These mediators may lead to epithelial lesions and increase the alveolocapillary barrier permeability.

There is much experimental evidence supporting the role of oxidants and oxidative injury in the pathogenesis of ALI. Evidence of oxidative stress and injury is common to the most experimental models of lung injury and is corroborated by studies of patients with ALI, underscoring the physiologic importance of these processes (21). In relation to the antioxidant parameters in blood involving CAT, GSH and uric acid activities we did not find statistical differences among the experimental groups. The SH analysis from the group that received intratracheal MK-801 treatment presented increased levels compared to the other experimental groups. However, the precise interpretation of these findings remains unclear.

An increase in the oxidative stress was observed in the group that received LPS, which could be seen by the increase of TBARS and NO levels in the plasma. However, the MK-801 treatment did not demonstrate statistical differences in these parameters among the groups.

Intratracheal instillation of LPS in rats induced a transient alveolitis characterized by neutrophil and macrophage influx and an increase in airway permeability to albumin, as reported earlier (22). The total cell influx (with predominance of neutrophils) in BALF showed almost immediate response after LPS challenge. The BALF analysis demonstrated an increase in the total cell count after intratracheal injection of LPS and these data confirm the publication by Ritter *et al* (2006) that also verified a cell increase in BALF at 12 hours after the intratracheal LPS injection (12). The MK-801 treatment administered via intraperitoneal or intratracheal promoted a decrease in the BALF total cell

count. Regarding the differential cell count in BALF, we could observe an increase in the neutrophil percentage and a decrease in the macrophage percentage. These findings confirm the study by Lenz *et al* (1999) that demonstrated an increase in the cell count, a decrease in the macrophage count and an increase of neutrophils in the BALF of patients with ARDS (23).

The concentration of total protein in the BALF increased rapidly after LPS challenge. In relation to the total protein concentration, an increase was observed in the group that received LPS while the use of MK-801 decreased the protein concentration. Said *et al* (2002) demonstrated in their work a protein concentration increase in BALF of ALI induced by paraquat and oxidase xanthine in rats, and when they used the MK-801, they verified a decrease of protein levels (24). The LDH activity determination was noticeably high at 12 hours after the LPS administration, while intraperitoneal MK-801 treatment decreased LDH activity when compared to the LPS group. Arselane K *et al* (2000) have demonstrated an increase in LDH activity at 24 hours after the same LPS administration and Dal-Pizzol *et al* (2006) have also verified a LDH activity increase at 12 hours after the LPA induction (25,26).

We demonstrated that this treatment interferes with oxidative stress and antioxidant enzyme imbalance. Iron can catalyze electron exchange with subsequent generation of oxidants that can damage host tissue. Iron-catalyzed oxidative stress can also participate in lung injury after exposure to many agents that have the capacity to disrupt normal iron homeostasis in the lung (27). In our study, we verified an iron decrease in the pulmonary tissue of the group that received intratracheal LPS administration, meanwhile the use of MK-

801 increased the iron concentration in the pulmonary tissue at a controlled level. However, the precise interpretation of these findings remains unclear.

Several studies have demonstrated depressed antioxidant levels in animal models and patients with ALI (28,29). The glutathione exists in the organism in both reduced form (GSH) and oxidized form (GSSG), functioning direct or indirectly in many important biological processes, including the protein synthesis, metabolism and cellular protection (30). The problems related to glutathione synthesis and metabolism are associated with many diseases, mainly to that related to the oxidative stress (31). The findings demonstrated a GSH increase in the animals treated with MK-801 administered via intraperitoneally.

Oxidative stress due to thiol depletion has been shown to play a role in the pathogenesis of various cardiovascular disorders such as hypertension and ischemia-reperfusion injury (32,33). We verified a decrease in SH quantity in the group that received LPS, and the use of MK-801 administered via intraperitoneally increased the SH antioxidant level compared to the LPS group.

CAT is also an important enzyme that reduces H_2O_2 to H_2O removing a key intermediate in the formation of hydroxyl radical (OH^\cdot) and acid hypochlorous (HOCl). In our study, we observed a decrease in the CAT activity in the LPS group while the use of MK-801 administered intraperitoneally promoted an increase in the enzyme activity when compared to the LPS group. Our results disagree with the results found by Ritter *et al* (2006) who verified an increase of CAT activity at 12 hours after LPS-induced ALI (12).

The SOD activity analysis demonstrated a significant decrease in the group that received intratracheal LPS injection and at dealing with animals

treated with MK-801, we verified a significant increase in the enzyme activity. Several studies have demonstrated the relation of extracellular SOD with decreased recruitment of neutrophils. One mechanism by which extracellular SOD might modulate neutrophil inflammation is by reducing cytokine release from macrophages. These findings suggest that extracellular SOD should be considered as an anti-inflammatory enzyme as well as a bulk antioxidant (34). Cells that overexpress SOD and mice transgenic for human showed some abnormalities related to oxidative stress (35). It seems that any concentration of SOD other than the optimal leads to increased lipid peroxidation and therefore to decrease cell viability. SOD activity results in the production of H_2O_2 , which can mediate membrane damage by lipid peroxidation or react with iron to generate $OH\cdot$ Via Fenton reaction, which is thought to be the most toxic oxygen molecule in vivo. CAT could remove an excess of peroxide, diminishing the oxidative effects of H_2O_2 . Several references demonstrated that an imbalance between SOD and CAT could participate in the genesis of several disease (36).

The lipoperoxidation analysis in the pulmonary tissue demonstrated increased TBARS levels in animals treated with LPS. The animals that received MK-801 treatment via intraperitoneally or intratracheally presented a lipoperoxidation decrease in the pulmonary tissue. These findings were described in the work by Ritter *et al* (2006) that observed a concentration increase of the TBARS levels in the pulmonary tissue after LPS administration (12). Our study also demonstrated an increase of NO levels in pulmonary tissue of the animals that received LPS whereas MK-801 treatment decreased NO production when treated via intraperitoneally.

Although the increased presence of iNOS and NO in ALI are thought to contribute importantly to the pathophysiology of ALI, this remains controversial. There is evidence that NO can contribute to glutamate neurotoxicity and the persistent hypotension of septic shock (37). We recently found that high concentrations of NMDA elicit acute high-permeability edema in animal lung, a model of excitotoxic injury already cited above (38).

In physiological conditions, intracellular glutamate concentrations are a thousand times higher than extracellular concentrations (39). Cell injury causes glutamate, together with ROS, to be released from within the cell, and most of the excessive glutamate responsible for neurotoxicity is derived endogenously from damaged cells. Excessive exposure to glutamate can be lethal to neurons, and glutamate toxicity has been implicated in neuronal loss in such acute conditions as hypoxia-ischemia, hypoglycemia, head injury, and stroke, as well as in chronic neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and AIDS dementia (40). Numerous investigators have examined the interactions between ROS and glutamate toxicity (41). Most of the evidence available deals with glutamate receptor activation as a source of ROS, and the role of ROS in accentuating excitotoxicity. ROS can exacerbate excitotoxicity through enhanced efflux of glutamate from rich intracellular sites, suppression of its uptake, and inhibition of glutamine synthase activity (42). The vicious cycle thus created tends to increase both the severity and the extent of the injury (43). The NMDA receptor blocker MK-801 seemed to be more protective against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Much progress has been made in understanding the pathophysiology and pathology of ALI. However, more studies have to be carried out in order to evaluate the

involvement of NMDA receptors in the oxidative stress and in the inflammatory process of important pathologies, such as ALI.

CONCLUSION

Our data provide the first experimental demonstration that MK-801 decreases oxidative stress and limits inflammatory response as well as alveolar disarray in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats.

REFERENCES

1. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, *et al* (1994) The American-European consensus conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149(3 Pt 1):818-824.
2. Ware LB & Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342 (18):1334-49.
3. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, *et al* (2003) Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(6):523-535.
4. Ischiropoulos H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356(1):1-11.
5. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, *et al* (1993) Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase: role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 268(23): 17131-1713.

- 6.** Fialkow L, Chan CK, Rotin D, *et al* (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils: role of oxidants. *J Biol Chem* 269(49):31234-31242.
- 7.** Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16(12):521-527.
- 8.** Lu YM, Yin HZ, Chiang J, *et al* (1996) Ca⁺²-permeable AMPA/Kainate and NMDA channels: high rate of Ca⁺² influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci* 16(17):5457-5465.
- 9.** Beal MF (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *Faseb J* 6(15):3338-3344.
- 10.** Erdo SL (1991) Excitatory amino acid receptors in the mammalian periphery. *Trends Pharmacol Sci* 12(11):426-429.
- 11.** Skerry TM, Genever PG (2001) Glutamate signaling in non-neuronal tissue. *Trends Pharmacol Sci* 22(4):174-181.
- 12.** Ritter C, Cunha AA, Echer IC, *et al* (2006) Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med* 34(2):1-7.
- 13.** Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-431.
- 14.** Sastry KVH, Moudgal RP, Mohan J, *et al* (2002) Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. *Analytical Biochemistry* 306(1):79-82.
- 15.** Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- 16.** Bannister JV, Calabrese L (1987) Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* 32:279-312.

- 17.** Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61(5):882-888.
- 18.** Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82(1):70-77.
- 19.** Brigham KL, Meyrich B (1986) Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133(5):913-927.
- 20.** Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, *et al* (1994) Cytokine expression by neutrophils and macrophages *in vivo*: endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor- beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10(2):148-153.
- 21.** Matthay MA, Geiser T, Matalon S, *et al* (1999) Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 27(9):2028-2030.
- 22.** Li XY, Donaldson K, Brown D, *et al* (1995) The role of tumor necrosis factor in increased airspace epithelial permeability in acute lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(2):185-195.
- 23.** Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, *et al* (1999) Oxidatively modified protein in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J* 13(1):169-174.
- 24.** Said SI, Pakbaz H, Berisha HI, *et al* (2000) NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radic Biol Med* 28(8):1300-1302.
- 25.** Arsalane K, Broeckaert F, Knoop B, *et al* (2000) Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intra-tracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med* 161(5):1621-1630.

- 26.** Dal Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, *et al* (2006) Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 173(1):84-90.
- 27.** Mateos F, Brock JH, Perez-Arellano JL (1998) Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax* 53(7):594-600.
- 28.** Metnitz PG, Bartens C, Fisher M, *et al* (1999) Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 25(2):180-185.
- 29.** Richard C, Lemonnier F, Thibault M, *et al* (1990) Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 18(1):4-9.
- 30.** Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52: 711-760.
- 31.** Navarro J, Obrador E, Carretero J, *et al* (1999) Changes in glutathione status and the oxidant system in blood and in cancer cells associated with tumor growth in vivo. *Free Rad Biol Med* 26(3-4):410-418.
- 32.** Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, *et al* (2000) Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 36(1):142-146.
- 33.** Oldham KM & Bowen PE (1998) Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc* 98(9):1001-1008.
- 34.** Bowler RP, Crapo JD (2002) Oxidative stress in airways: Is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 166:S38-S43.
- 35.** McCord JM (1998) The importance of oxidant-antioxidant balance. *In*: Montagneir L, Olivier R, Pasquier C (eds) *Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases*. Dekker, New York, pp 1-8.

- 36.** Dal-Pizzol F, Klamt F, Bernard EA, *et al* (2001) Retinol supplementation induces oxidative stress and modulates antioxidant enzyme activities in rat Sertoli cells. *Free Radic Res* 34(4):395-404.
- 37.** Dawson VL, Dawson TM, London ED, *et al* (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci* 88(14):6368-6371.
- 38.** Said SI, Berisha HI, Pakbaz H (1996) Excitotoxicity in lung: *N*-methyl-*D*-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Nat Acad Sci* 93(10):4688-4692.
- 39.** Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl J Med* 330(9):613-622.
- 40.** Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- 41.** Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134): 689-695.
- 42.** Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM (1998) Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* 18:667-682.
- 43.** Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.

TABLES

Table 1. Antioxidants activity in the blood after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

	Sham	LPS	LPS + MK-801 IP	LPS + MK-801 IT
Uric Acid in plasma mg/dL	1.43 ± 0.09	1.35 ± 0.18	1.43 ± 0.11	1.39 ± 0.23
Catalase in blood U/g Hb	0.33 ± 0.034	0.42 ± 0.029	0.43 ± 0.056	0.35 ± 0.029
GSH in blood µmol/g Hb	25.1 ± 0.89	25.7 ± 1.7	22.6 ± 2.2	20.8 ± 1.7
SH in plasma µM/ g Hb	137.0 ± 23.6	135.2 ± 5.8	139.0 ± 11.9	230.9 ± 14.5 *# [∞]

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical differences are represented as *P<0.05, compared to sham group, #P<0.05 compared to LPS, and [∞]P<0.05 compared to LPS+MK-801 IP.

Table 2. Oxidative stress variables in the plasma after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

Plasma	Sham	LPS	LPS + MK-801 IP	LPS + MK-801 IT
TBARS nmol/g prot	0.31 ± 0.035	0.43 ± 0.031 *	0.38 ± 0.028	0.37 ± 0.028
NO µM/ g prot	0.30 ± 0.024	0.47 ± 0.052 *	0.44 ± 0.032	0.39 ± 0.056

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical differences are represented as *P<0.05, compared to sham group.

Table 3. Total and differential cell counts in BALF after intratracheal lipopolysaccharide (LPS) instillation

Blood	Sham	LPS	LPS + MK-801 IP	LPS + MK-801 IT
Total Cell x 10 ⁵ cells/µL	16.0 ± 1.3	279.0 ± 16.5 *	149.6 ± 12.2 *#	128.7 ± 4.6 *#
Macrophages %	84.6 ± 0.81	23.7 ± 1.0 *	28.4 ± 3.6 *	25.8 ± 2.4 *
Neutrophils %	15.4 ± 0.80	76.3 ± 1.0 *	72.8 ± 2.9 *	74.2 ± 2.4 *

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical differences are represented as *P<0.05, compared to sham group, #P<0.05 compared to LPS.

FIGURES

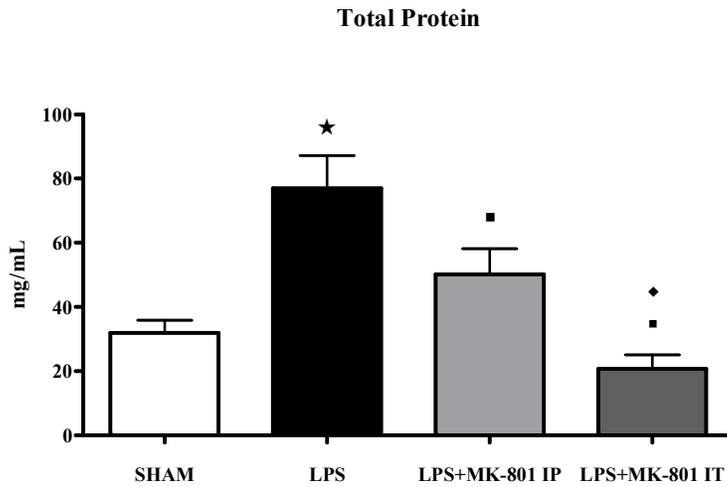


Figure 1. Total protein in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as * $P < 0.05$, compared to sham group, [■] $P < 0.05$, compared to LPS, and [◆] $P < 0.05$, compared to LPS + MK-801 IP.

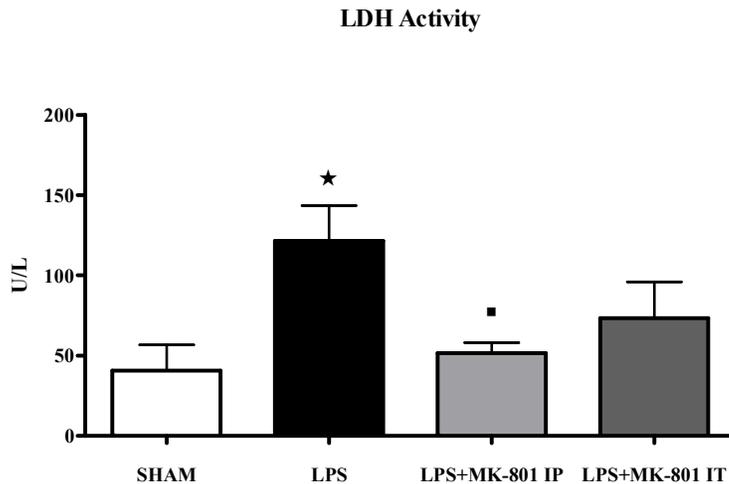


Figure 2. LDH activity in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as * $P < 0.05$, compared to sham group, and [■] $P < 0.05$, compared to LPS.

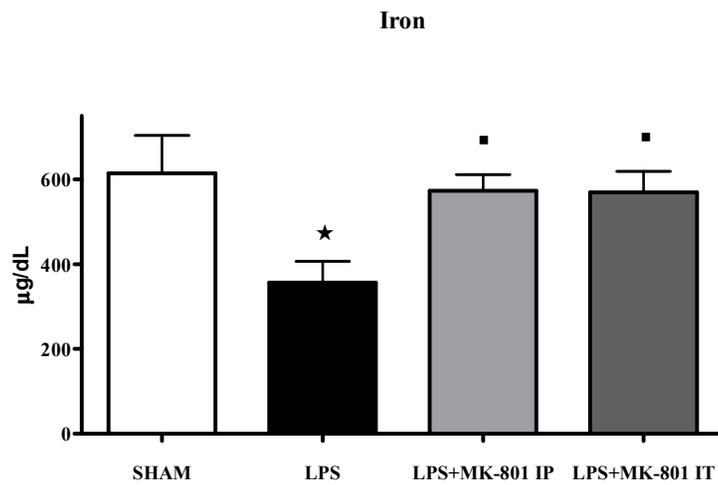


Figure 3. Iron in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as * $P < 0.05$, compared to sham group, and [■] $P < 0.05$, compared to LPS.

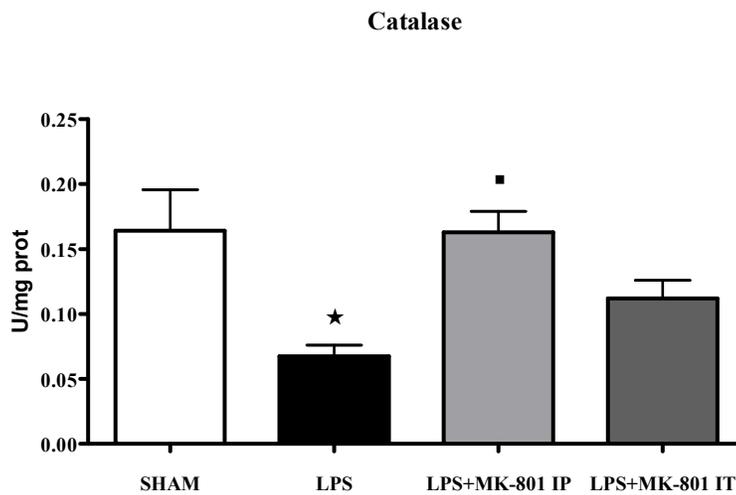


Figure 4. Catalase in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as * $P < 0.05$, compared to sham group, and [■] $P < 0.05$, compared to LPS.

GSH

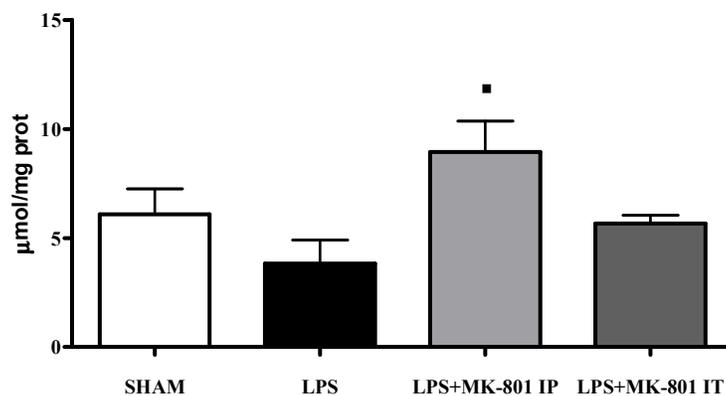


Figure 5. GSH in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as \blacksquare $P < 0.05$, compared to LPS.

SH

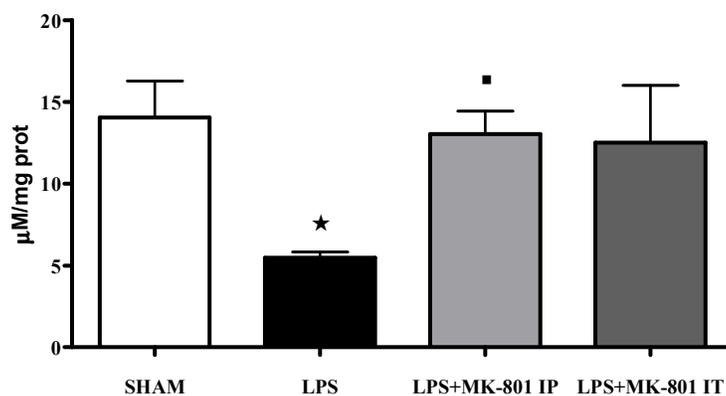


Figure 6. SH in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as $\star P < 0.05$, compared to sham group, and $\blacksquare P < 0.05$, compared to LPS.

SOD

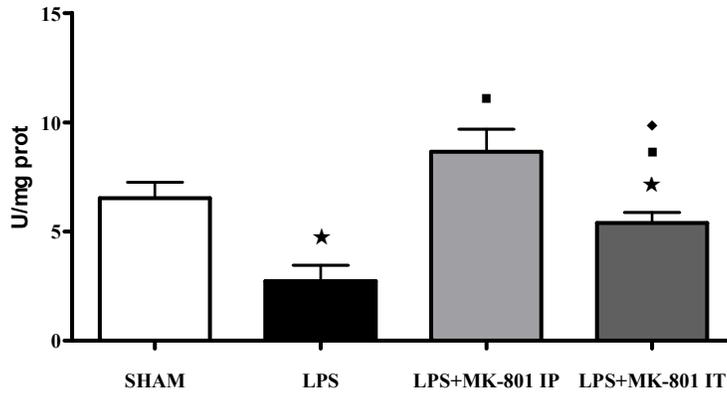


Fig 7. SOD in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as *P<0.05, compared to sham group, ■P<0.05, compared to LPS, and ♦P<0.05, compared to LPS + MK-801 IP.

TBARS

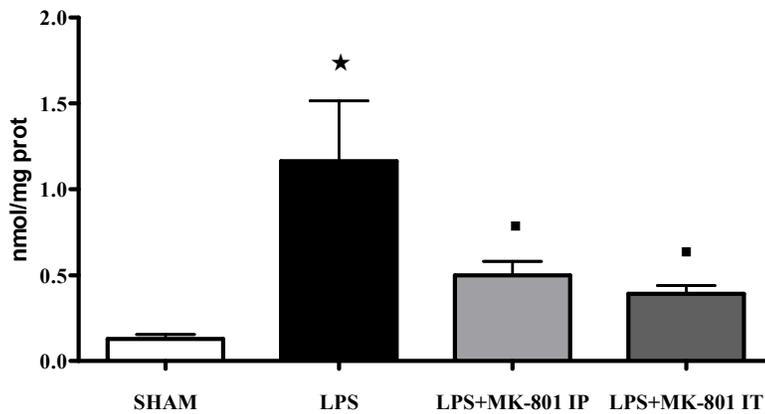


Fig 8. TBARS in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as *P<0.05, compared to sham group, and ■P<0.05, compared to LPS.

NO

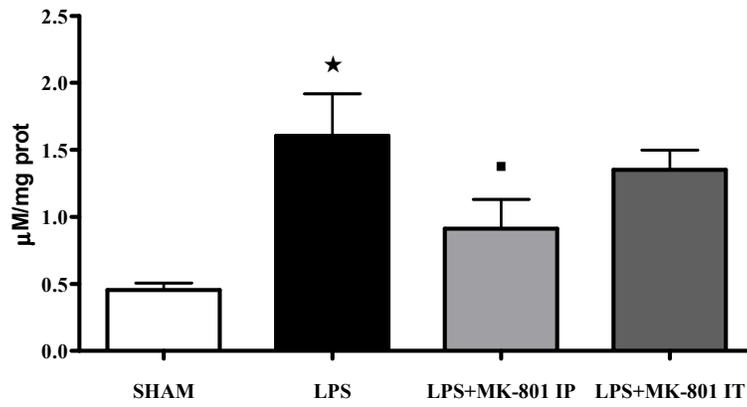


Figure 9. NO in rats at twelve hours after the administration of MK-801 (0.3 mg/kg). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical differences are represented as * $P < 0.05$, compared to sham group, and \blacksquare $P < 0.05$, compared to LPS.

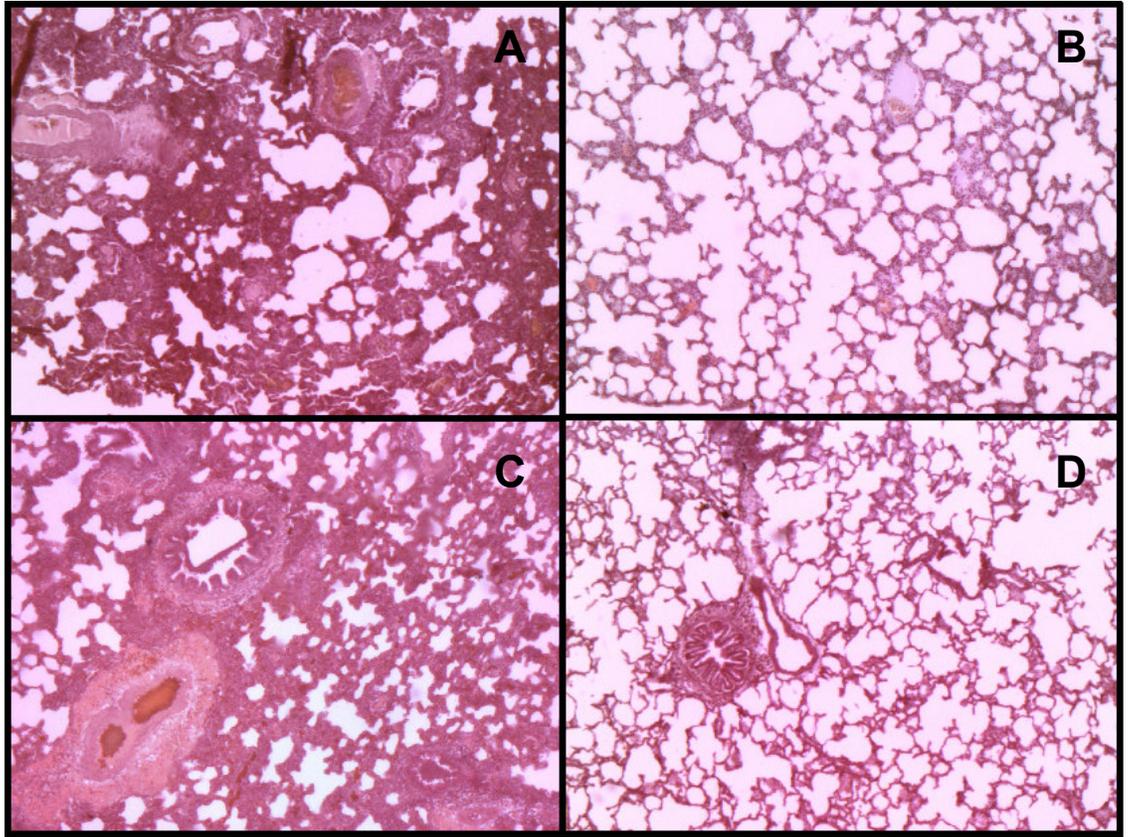


Figure 10. Histopathologic findings after lipopolysaccharide (LPS) instillation. Rats were submitted to intratracheal administration of LPS or saline. Sham received saline intratracheally (**Fig10D**), LPS-administered animals were assigned to receive saline (**Fig10A**), LPS-administered animals plus treatment with MK-801 intraperitoneally (**Fig10B**), LPS-administered animals plus treatment with MK-801 intratracheally (**Fig10C**). Twelve hours after LPS administration, the lung was removed for histopathologic analysis. Representative illustration from six animals each group (hematoxylin and eosin x 50).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho verificou-se que o uso de um potente antagonista específico, seletivo e não-competitivo do receptor NMDA (MK-801) diminuiu o dano oxidativo, aumentou os níveis de antioxidantes e promoveu uma melhora do processo inflamatório em nosso modelo de LPA induzida através da injeção intratraqueal de LPS. Vários estudos demonstram diferentes efeitos do tratamento com MK-801 no SNC. Benvenga *et al* (1988) verificaram que o uso do MK-801 prejudica de maneira dose-dependente a memória e a aprendizagem em modelos animais (77). Outro estudo realizado por de Lima *et al* (2005) demonstrou que o uso do MK-801 prejudica a consolidação da memória de curta e longa duração no reconhecimento de objetos (78). Esses dados corroboram com a idéia de que os receptores NMDA participam da fase de consolidação do processamento da memória. Também foi descrito que o tratamento com doses diárias de MK-801 pode exacerbar os sintomas positivos e negativos da psicose, como os encontrados em pacientes com esquizofrenia (79). Vários são os estudos que utilizam o MK-801; entretanto, a maioria destes estudos se limita em estudar seus efeitos no SNC, sendo poucos os estudos descritos na literatura que analisam os efeitos do MK-801 no sistema nervoso periférico (SNP).

Cabe salientar que o modelo de LPA empregado não apresenta mortalidade, apenas mimetiza as alterações inflamatórias encontradas em pacientes com SARA. Além disso, as alterações mecânicas observadas em pacientes com SARA também não se aplicam ao modelo de instilação intratraqueal de LPS e, este modelo, não permite caracterizar as diferenças

entre SARA pulmonar e extra-pulmonar (80). Normalmente, os melhores modelos animais de SARA utilizam animais de grande porte, sob ventilação mecânica, para mimitizar as alterações clínicas e o suporte terapêutico de situações reais, mas este tipo de modelo extrapola os objetivos do presente estudo.

Existem evidências experimentais sobre o papel de oxidantes e antioxidantes na patogênese da LPA. Vários estudos reportam que o aumento na produção de RLs combinado com uma diminuição da capacidade antioxidante no tecido pulmonar podem contribuir para o mau prognóstico de pacientes com LPA (1). Em relação à atividade antioxidante, no sangue não foram detectados diferenças estatísticas entre os grupos experimentais estudados na determinação da atividade da CAT, GSH e ácido úrico. Isso pode ter ocorrido pelo fato do nosso modelo experimental não ser tão agressivo, impedindo uma alteração do *status* antioxidante no sangue.

Os grupamentos sulfidril (SH) são essenciais para a manutenção das atividades enzimáticas de outros processos que dependem da integridade das macromoléculas, porque participam de processos metabólicos complexos. Alterações no balanço dissulfeto, como oxidação destes grupamentos, podem afetar a integridade das membranas, a homeostasia do cálcio, alterações enzimáticas e protéicas, bem como de outras macromoléculas essenciais, incluindo dano ao DNA, ocasionando assim, danos celulares irreversíveis e letais (81). Foi verificado que o tratamento com MK-801 promoveu um aumento dos níveis de SH no sangue no grupo que recebeu administração de MK-801 por via intratraqueal, quando comparado aos demais grupos experimentais.

Entretanto, não encontramos justificativas na literatura que demonstrem um efeito do tratamento com MK-801 em aumentar os níveis de SH.

Ao analisarmos o dano oxidativo induzido pela administração de LPS, observamos que ocorreu um aumento no estresse oxidativo no grupo com LPA, verificado através do aumento dos níveis de TBARS e de NO no sangue. Esses achados corroboram com os resultados obtidos por Richard *et al* (1990) que observaram um aumento nos produtos de peroxidação lipídica no sangue de pacientes com SARA (82). Entretanto, o uso do MK-801 não promoveu uma diminuição significativa nesses parâmetros analisados.

Sabe-se que a LPA inicia-se como uma lesão inflamatória primária caracterizada por um acúmulo de macrófagos alveolares e neutrófilos no trato respiratório inferior. Observamos um aumento importante no infiltrado celular, através do aumento da contagem de células totais no LBA dos animais 12 horas após a injeção intratraqueal de LPS. Esses achados corroboram com o estudo realizado por Lenz *et al* (1999) que verificaram um aumento na contagem de células totais, uma diminuição da percentagem de macrófagos alveolares e um aumento da percentagem de neutrófilos no LBA de pacientes com SARA e com risco para o desenvolvimento de SARA (83). O tratamento com MK-801 promoveu uma diminuição importante do infiltrado celular no LBA nos animais tratados com MK-801, sugerindo uma possível participação dos receptores NMDA na formação do edema alveolar.

A fase exudativa está associada a uma rápida evolução para falência respiratória em pacientes com fatores de risco para LPA. Achados patológicos incluem dano alveolar difuso com infiltração de neutrófilos, macrófagos, eritrócitos, formação de membrana hialina e edema alveolar rico em proteínas

(1). O edema alveolar rico em proteína, como mencionado acima, é um importante evento na fisiopatologia da LPA (1). Nosso estudo demonstrou um aumento significativo na concentração de proteínas totais no LBA dos animais após 12 horas da injeção intratraqueal de LPS. Esses achados foram descritos por diversos autores, que verificaram um aumento da concentração protéica após a injeção intratraqueal de LPS (84). O tratamento com MK-801, administrado por via intraperitoneal ou por via intratraqueal, promoveu uma diminuição significativa da concentração de proteínas totais no LBA. Said *et al* (2002) demonstraram em seu estudo um aumento da concentração de proteínas totais no LBA de ratos com LPA induzida através de paraquat e xantina oxidase. Ao tratarem os animais com MK-801, os autores verificaram uma diminuição da concentração de proteínas totais, corroborando com nosso achado (58). Ao analisarmos a atividade da LDH, verificamos um aumento em sua atividade nos animais com LPA, sendo que o tratamento com MK-801 administrado por via intraperitoneal promoveu uma diminuição na atividade da LDH no LBA. Dal-Pizzol *et al* (2006) também verificaram um aumento na atividade da LDH, 12 horas após a indução de LPA por injeção intratraqueal de LPS. Arsalane *et al* (2000) demonstraram em seu estudo um aumento da atividade da LDH 24 horas após a administração da mesma dose de LPS (84,85).

O ferro está presente em algumas enzimas que catalisam mecanismos de oxidação celular; sendo de grande importância nos sistemas biológicos, onde participa de uma grande variedade de reações de transporte de elétrons. Porém, esse íon pode estimular a produção de RLs por diferentes mecanismos: por degradar hidroperóxidos lipídicos pré-existentes (ROOH) nos tecidos,

formando o radical lipídico alcóxil (RO[•]); por participar das reações do tipo Fenton produzindo radicais hidroxil (OH[•]) ou por formar complexos com O₂, os quais são responsáveis por iniciar as reações de peroxidação lipídica (86,87). Portanto, a quantidade de ferro no tecido pode ser um importante mediador da toxicidade e dos danos oxidativos no tecido pulmonar.

Em nosso estudo, verificamos uma diminuição do ferro no tecido pulmonar no grupo que recebeu administração intratraqueal de LPS. Além disso, o tratamento com MK-801 aumentou a concentração de ferro no tecido pulmonar em níveis próximos aos controles. Esse achado difere com alguns estudos publicados na literatura, que demonstram que concentrações elevadas deste metal são encontradas no trato respiratório inferior de pacientes com SARA (88). Embora esse resultado seja importante em nosso estudo não encontramos justificativas na literatura que demonstrem um efeito de aumento de ferro no tecido pulmonar após a administração de MK-801.

Muitos estudos demonstram uma diminuição dos níveis de antioxidantes em modelos animais e em pacientes com LPA (82,89). A GSH está presente em altas concentrações no LBA conferindo uma proteção ao pulmão contra o dano oxidativa. A GSH existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, o metabolismo e a proteção celular (90). Problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a várias doenças, principalmente às relacionadas ao estresse oxidativo (91). Pacht *et al* (1991) realizaram um estudo em pacientes com SARA e verificaram uma diminuição dos níveis de GSH no LBA quando comparados com pacientes saudáveis (92). Em nosso estudo, verificamos um

aumento da GSH no tecido pulmonar dos animais tratados com MK-801 administrado por via intraperitoneal, recuperando os níveis deste antioxidante quando comparado aos animais com LPA.

O estresse oxidativo deve-se, em parte, à depleção de SH, que tem um papel na patogênese de várias doenças cardiovasculares como a hipertensão e danos de isquemia e reperfusão (93,94). Verificamos uma diminuição na concentração de SH no grupo que recebeu LPS quando comparado ao grupo sham. O uso de MK-801 administrado por via intraperitoneal promoveu um aumento significativo na concentração de SH no tecido pulmonar.

A depleção da atividade da CAT e da SOD no tecido pulmonar refletem diretamente a produção de RLs no pulmão. Em nosso estudo observamos uma diminuição da atividade da CAT no grupo LPS e o tratamento com MK-801, administrado por via intraperitoneal, promoveu uma recuperação na atividade da enzima quando comparada ao grupo LPS. Nossos resultados divergem dos resultados obtidos por Ritter *et al* (2006) que verificaram que após 12 horas da indução da LPA, através da injeção intratraqueal de LPS, a atividade da CAT encontrava-se aumentada (95). Alguns autores descrevem que a infusão de CAT pode diminuir a peroxidação lipídica no pulmão após a administração de endotoxina (96). Outro estudo realizado por Chung-Man *et al* (2001) em pacientes portadores de câncer de pulmão, mostrou que a atividade da CAT encontrava-se diminuída em relação aos pacientes que não apresentavam câncer (97). Ao analisarmos a atividade da SOD verificamos uma diminuição significativa no grupo que recebeu injeção intratraqueal de LPS e, ao tratarmos os animais com MK-801 por via intraperitoneal ou por via intratraqueal foi observado um aumento significativo na atividade da enzima no tecido

pulmonar. Estudos relatam que a infusão de SOD atenua o dano pulmonar induzido por endotoxina em modelos animais utilizando porcos e ovelhas (98,99).

Alguns estudos reportam um importante papel da SOD extracelular na redução da lesão pulmonar provocada pela produção de EROs em modelos animais, após a administração de bleomicina (100). Outros estudos demonstram a existência de uma relação da SOD extracelular com a diminuição do recrutamento de neutrófilos, além de estar também relacionada com uma redução da expressão de moléculas de adesão (101). Um mecanismo proposto para os efeitos produzidos pela SOD extracelular seria pelo fato de ela poder modular a inflamação através da redução do aumento da liberação de citocinas pelos macrófagos, sugerindo uma possível ação antiinflamatória (101).

Uma ação orquestrada destas enzimas é necessária para a proteção celular contra o estresse oxidativo. Tem sido reportado que o desequilíbrio entre SOD e CAT/GSH-Px aumenta o dano celular desencadeado pelos EROs e participa da gênese de várias doenças (102). Uma superexpressão da SOD resulta na produção excessiva de H_2O_2 , que pode mediar dano às membranas através da peroxidação lipídica ou reagir com ferro para gerar radical OH^\cdot via reação de Fenton. Um aumento proporcional da CAT poderia limpar este excesso de H_2O_2 . Porém, já é descrito que o excesso de EROs poderia oxidar o sítio ativo da CAT, levando à inativação da enzima (102).

Verificamos que nosso modelo de LPA, através da administração intratraqueal de LPS, promoveu um intenso infiltrado inflamatório, além da presença de um abundante exudato alveolar verificado através da análise histopatológica do tecido pulmonar. O tratamento com MK-801 administrado

por via intraperitoneal promoveu uma melhora do infiltrado de neutrófilos e do exsudato alveolar, mas não a reversão completa do processo inflamatório. Este achado pode ser correlacionado com nossos resultados da análise diferencial de células no LBA, que demonstrou que o tratamento com MK-801 diminuiu a contagem de células totais, mas não diminuiu a percentagem das células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, presentes no LBA.

A análise da lipoperoxidação no tecido pulmonar demonstrou um aumento dos níveis de TBARS nos animais tratados com LPS. Os animais que receberam o tratamento com MK-801, administrado por via intraperitoneal ou por via intratraqueal tiveram uma redução nos níveis de TBARS. Esses achados foram descritos no estudo realizado por Ritter *et al* (2006), que observaram um aumento da concentração dos níveis de TBARS no tecido pulmonar após administração de LPS, assim como observaram uma melhora do dano oxidativo após o tratamento com drogas antioxidantes (95). Nossos resultados também demonstraram um aumento dos níveis de NO no tecido pulmonar dos animais que receberam LPS, sendo que o tratamento com MK-801 administrado por via intraperitoneal diminuiu a produção de NO, quando comparado aos animais com LPA induzida através da injeção intratraqueal de LPS. O NO está descrito como um mensageiro retrógrado, por ser produzido em células pós-sinápticas e atuar em células pré-sinápticas, aumentando a liberação de glutamato (103). Nos neurônios, a síntese de NO é estimulada pelo influxo de Ca^{+2} através da ativação dos receptores glutamatérgicos, preferencialmente receptores NMDA (104).

A toxicidade do glutamato não está apenas limitada ao SNC. Os receptores de glutamato também estão presentes no SNP. Said *et al* (1996)

demonstraram que altas concentrações de NMDA instilado na traquéia de animais eram responsáveis pelo aparecimento de edema no tecido pulmonar e, posteriormente, outro estudo do mesmo autor demonstrou que o uso do MK-801 atenuava o dano pulmonar causado pela administração de paraquat ou xantina oxidase, sugerindo o envolvimento dos receptores NMDA como mediadores da LPA (74).

O tratamento com MK-801 não se mostrou efetivo em melhorar esses parâmetros no sangue. Uma possível explicação para esses resultados é que, após a administração do MK-801, esta droga se distribua na circulação sanguínea em direção aos principais tecidos do organismo e sua efetividade de ação possa ter ocorrido nos tecidos que possuem maior expressão do receptor NMDA, promovendo assim, uma melhora dos parâmetros analisados no pulmão por bloquear as ações tóxicas desencadeadas pela ativação do receptor NMDA.

Com os presentes dados não podemos determinar os mecanismos exatos envolvidos na melhora dos parâmetros analisados em nosso modelo experimental de LPA. Assim, mais estudos são necessários para o completo entendimento da participação dos receptores NMDA na fisiopatologia da LPA. Os resultados deste estudo compreendem a primeira demonstração experimental de um possível envolvimento dos receptores NMDA na fisiopatologia da LPA induzida por injeção intratraqueal de LPS. Estes achados abrem novas perspectivas norteando futuras investigações sobre o envolvimento da sinalização glutamatérgica, via receptores NMDA, na fisiopatologia ou como nova estratégia terapêutica para patologias importantes como a LPA/SARA.

5 CONCLUSÕES

- O uso de um antagonista do receptor NMDA (MK-801) promoveu uma diminuição do influxo de células, verificado através da diminuição da contagem de células totais no LBA;
- O MK-801 promoveu uma diminuição dos níveis de proteínas totais e uma diminuição na atividade da enzima LDH no LBA, quando comparada ao grupo que recebeu apenas administração intratraqueal de LPS;
- O uso do MK-801 não alterou os parâmetros antioxidantes analisados no sangue (ácido úrico, CAT e GSH), exceto os níveis de SH que aumentaram com o tratamento intratraqueal com o MK-801;
- O MK-801 não promoveu uma diminuição do dano oxidativo no sangue (TBARS) e, não diminuiu os níveis de NO em relação ao grupo que recebeu injeção intratraqueal de LPS;
- O tratamento com MK-801 recuperou os níveis de antioxidantes (CAT, SOD, GSH e SH) no tecido pulmonar;
- O tratamento com MK-801 promoveu uma recuperação dos níveis de ferro no tecido pulmonar quando comparado aos demais grupos experimentais;

- A análise do dano oxidativo através da avaliação dos níveis de TBARS e dos níveis de NO demonstrou que o uso de MK-801 promoveu uma diminuição destes parâmetros no tecido pulmonar;
- O tratamento com MK-801 promoveu uma melhora do infiltrado inflamatório observado no tecido pulmonar através da análise histopatológica.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade deste estudo, destacamos:

- Melhor entendimento dos mecanismos de ação do MK-801 sobre os macrófagos alveolares, tentando compreender as vias de sinalização intracelulares envolvidas neste processo inflamatório;
- Realizar a mensuração dos níveis de glutamato no LBA e no tecido pulmonar;
- Avaliar algumas interleucinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) e antiinflamatórias (IL-10) no LBA e no tecido pulmonar nos diferentes grupos experimentais;
- Utilizar ferramentas de biologia molecular para avaliar a expressão de alguns subtipos do receptor NMDA (NMDAR 1 e NMDAR 2A) em nosso modelo de LPA por injeção intratraqueal de LPS.

7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ware LB & Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; 342(18):1334-1349.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, *et al.* Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 2(7511):319-323.
3. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, *et al.* Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intens Care Med* 1994; 20(3): 225-232.
4. Artigas A, Bernard GR, Carlet J, *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS, Part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(4Pt 1):1332-1347.
5. Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, *et al.* Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 1982; 144(1):124-13.
6. Tomashefski JF Jr. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 2000; 21(3): 435-466.
7. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, *et al.* The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999; 27(2):304-312.
8. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest* 1991; 88(3):864-875.

9. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, *et al.* Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(5 Pt 1):1450-1456.
10. Sznajder JI. Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(5 Pt 1):1441-1442.
11. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, *et al.* Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(6):1843-1850.
12. Lewis JF & Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(1):218-233.
13. Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, *et al.* Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991; 88(6):1976-1981.
14. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, *et al.* Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999; 104(6):743-750.
15. Bitterman PB. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *Am J Med* 1992; 92 (6A): 39S-43S.
16. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, *et al.* Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155(4):1187-1205.
17. Bachofen M & Weibel ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1982; 3(1):35-56.

- 18.** Ware LB & Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired on the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(6):1376-1383.
- 19.** Matthay MA & Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(6 Pt 1):1250-1257.
- 20.** Frank JA, Parsons PE, Matthay MA. Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies. *Chest* 2006; 130(6):1906-1914.
- 21.** Wheeler AP & Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 2007; 369(9572): 1553-1564.
- 22.** Martin TR. Lung cytokines and ARDS. Roger S. Mitchell Lecture. *Chest* 1999; 116 (1 Suppl):2S-8S.
- 23.** Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348(2):138-150.
- 24.** Bachofen A & Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116(4):589-615.
- 25.** Del Maestro R, Thaw HH, Bjork J, *et al.* Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 1980; 492:43-57.
- 26.** Halliwell B & Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2th edition. Clarendon Press. Oxford, 1989.
- 27.** Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47-95.

- 28.** Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 1993; 32(1):71-110.
- 29.** Southorn PA & Powis G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988; 63(4):381-389.
- 30.** Tyler DD. A protective function of superoxide dismutase during respiratory chain activity. *Biochim Biophys Acta* 1975; 396(3): 335-346.
- 31.** Larramendy M, Mello-Filho AC, Martins EA, *et al.* Iron-mediated induction of sister-chromatid exchanges by hydrogen peroxide and superoxide anion. *Mutat Res* 1987; 178(1):57-63.
- 32.** Shaw RW, Hansen RE, Beinert H. The oxygen reactions of reduced cytochrome c oxidase. Position of a form with an unusual EPR signal in the sequence of early intermediates. *Biochim Biophys Acta* 1979; 548(2):386-396.
- 33.** Duthie GG, Wahle KW, Harris CI, *et al.* Lipid peroxidation, antioxidant concentration, and fatty acid contents of muscle tissue from malignant hyperthermia-susceptible swine. *Arch Biochem Biophys* 1992; 296(2):592-596.
- 34.** Machlin LJ & Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1(6):441-445.
- 35.** Abdalla DSP. Radicais Livres e antioxidantes. *Fundamentos de toxicologia.* Atheneu 1996; 38-57.
- 36.** Sies H & Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* 1991; 8(2): 211-218.
- 37.** Bowler RP, Velsor LW, Duda B, *et al.* Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31(9):2309-2315.

- 38.** Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, *et al.* Exhaled breath condensate nitrite and its relation to tidal volume in acute lung injury. *Chest* 2003; 124(3):1046-1052.
- 39.** Boveris A & Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134(3):707-716.
- 40.** Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, *et al.* Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 1989; 73(1):334-339.
- 41.** Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77:325-333.
- 42.** Maiorino M, Gregolin C, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1990; 186:448-457.
- 43.** Bryan CL, Cohen DJ, Dew JA, *et al.* Glutathione decreases the pulmonary reimplantation response in canine lung autotransplants. *Chest* 1991; 100(6):1694-1702.
- 44.** Deneke SM & Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; 257(4 Pt 1):L163-173.
- 45.** Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1990; 63:69-172.
- 46.** Van Asbeck BS, Hoidal J, Vercellotti GM, *et al.* Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science* 1985; 277(4688):756-759.
- 47.** Deby C & Deby-Dupont G. Mechanism of intervention of uric acid metabolism in PG biosynthesis. *Agents Actions* 1981; 11(6-7):651-652.

- 48.** Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissue. *Medicina (B Aires)* 1998; 58(4):350-356.
- 49.** Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268 (17):12231-12234.
- 50.** Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-142.
- 51.** Endo S, Inad K, Yamada Y, *et al.* Functional modification of vascular endothelial cells by cytokines during septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 94(1): 23-38.
- 52.** Parratt JR. Nitric oxide: A key mediator in sepsis and endotoxemia? *J Physiol Pharmacol* 1998; 48(4): 493-506.
- 53.** Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343 (8907):1199-1206.
- 54.** Hollmann M & Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17:31–108.
- 55.** Skerry TM & Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissue. *Trends in Pharmacol Sci* 2001; 22(4):174-181.
- 56.** Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995; 375(6533):645–653.
- 57.** Said SI, Pakbaz H, Beriska HI, *et al.* NMDA receptor activation: activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(8):1300-1302.
- 58.** Dingledine R, Borges K, Bowie D, *et al.* The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51(1):7–61.
- 59.** Cotman CW, Kahle JS, Miller SE, *et al.* Excitatory amino acid neurotransmission. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. In: Borroni E, Kupfer DJ, eds. New York: Raven Press Ltd; 1995.

60. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociência: desvendando o sistema nervoso. 2ªed, Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2002.
61. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neurobiol 1998; 54(5):581-618.
62. Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. Behav Brain Res 2003; 140(1-2):1-47.
63. Javitt DC, Zukin SR. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. Mol Psychiatry 2004; 9(11):984-979.
64. Olney JW & Farber NB. NMDA antagonists neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol 1995; 13(4):335-345.
65. Bjerkenstedt L, Edman G, Sedvall G, *et al.* Plasma amino acids in relation to cerebrospinal fluid monoamine metabolites in schizophrenic patients and healthy controls. Br J Psychiatry 1985; 147:276-282.
66. Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Phospholipase A₂, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. Antiox Redox Signal 2003; 5(5):647-654.
67. Jiang Q, Gu Z, Zhang G, *et al.* Diphosphorylation and involvement of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons. Brain Res 2000; 857(1-2):71-77.
68. Sastry PS & Rao KS. Apoptosis and the nervous system. J Neurochem 2000; 74(1):1-20.
69. Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, *et al.* Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. Int J Neuropsychopharmacol 1997; 17(3):141-150.

- 70.** Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, *et al.* Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999; 98(4):427-436.
- 71.** Heresco-Levy U. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-based treatment approaches in schizophrenia: the first decade. *Int J Neuropsychopharmacol* 2000; 3(3):243-258.
- 72.** Korpi ER, Kaufmann CA, Marnela KM, *et al.* Cerebrospinal fluid amino acid concentration in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res* 1987; 20(4):337-345.
- 73.** Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, *et al.* Study of a new schizophrenomimetic drug; Sernyl. *AMA Arch Neurology Psychiatry* 1959; 81(3):363-369.
- 74.** Said SI, Berisha HI, Pakbaz H. Excitotoxicity in the lung: N-Methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edemas attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad* 1996; 93(10): 4688-4692.
- 75.** Nei K, Matsuyama S, Shuntoh H, *et al.* NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 1996; 728(1):105-110.
- 76.** Dickman KG, Youssef JG, Mathew SM, *et al.* Ionotropic glutamate receptors in lung and airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30(2):139-144.
- 77.** Benvenga MJ, Spaulding TC. Amnesic effect of the novel anticonvulsant MK-801. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 30:205-207.
- 78.** de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, *et al.* Pré-or-post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 2005; 156(1):139-143.

- 79.** Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148:1301-1308.
- 80.** Kobayashi T, Tashiro K, Cui X, *et al.* Experimental models of acute respiratory distress syndrome: clinical relevance and response to surfactant therapy. *Biol Neonate* 2001; 80(Suppl 1):26-28.
- 81.** Ziegler DM. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-dissulfides in metabolic regulation. *Annu Rev of Biochem* 1985; 54:305-329.
- 82.** Richard C, Lemonnier F, Thibault M, *et al.* Vitamin E deficiency and lipoperoxidation during adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1990; 18(1):4-9.
- 83.** Lenz AG, Jorens PG, Meyer B, *et al.* Oxidatively modified protein in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *Eur Respir J* 1999; 13(1):169-174.
- 84.** Dal-Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, *et al.* Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(1):84-90.
- 85.** Arsalane K, Broeckaert F, Knoop B, *et al.* Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5):1621-1630.
- 86.** Braughler JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J Biol Chem* 1986; 261(22):1082-1089.

- 87.** Oubidar M, Marie C, Mossiat C, *et al.* Effects of increasing intracellular reactive iron level on cardiac function. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28(8):1769-1776.
- 88.** Ghio AJ, Carter JD, Richards JH, *et al.* Iron and iron-related protein in the lower respiratory tract of patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31(2):395-400.
- 89.** Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, *et al.* Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999; 25(2):180-185.
- 90.** Meister A & Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52:711-760.
- 91.** Navarro J, Obrador E, Carretero J, *et al.* Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Rad Biol Med* 1999; 26(3-4):410-418.
- 92.** Pacht ER, Timerman AP, Lykens MG, *et al.* Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1991; 100(5):1397-1400.
- 93.** Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, *et al.* Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 2000; 36(1):142-146.
- 94.** Oldham KM & Bowen PE. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc* 1998; 98(9):1001-1008.
- 95.** Ritter C, Cunha AA, Echer IC, *et al.* Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med* 2006; 34(2):1-7.

- 96.** Demling R, Lalonde C, Seekamp A, *et al.* Endotoxin causes hydrogen peroxide-induced lung lipid peroxidation and prostanoid production. *Arch Surg* 1988; 123(11):1337-1341.
- 97.** Chung-man Ho J, Zheng S, Camhair SA, *et al.* Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61(23):8578-8585.
- 98.** Suzuki Y, Tanigaki T, Heimer D, *et al.* Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase attenuates septic lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(2 Pt 1):388-393.
- 99.** Amari T, Kubo K, Kobayashi T, *et al.* Effects of recombinant human superoxide dismutase on tumor necrosis factor-induced lung injury in awake sheep. *J Appl Physiol* 1993; 74(6):2641-2648.
- 100.** Bowler RP, Nicks M, Warnick K, *et al.* Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(4):L719-L726.
- 101.** Bowler RP & Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(12 Pt 2):S38-43.
- 102.** Park EM, Ramnath N, Yang GY, *et al.* High superoxide dismutase and low glutathione peroxidase activities in red blood cells predict susceptibility of lung cancer patients to radiation pneumonitis. *Free Rad Biol Med* 2007; 42(2):280-287.
- 103.** Meyer RC, Spangler EL, Patel N, *et al.* Impaired learning in rats in a 14-unit T-maze by 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, is

attenuated by the nitric oxide donor, molsidomine. *European J of Pharmacol* 1998; 341(1):17-22.

104. Prast H & Philippu A. Nitric Oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 2001; 64(1):51-68.

ANEXO 1: DOCUMENTO DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

INTENSIVE CARE MEDICINE



Treatment with NMDA receptor antagonist (MK-801) protects against oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat

Journal:	<i>Intensive Care Medicine</i>
Manuscript ID:	draft
Article Type:	Experimental
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	da Cunha, Aline; PUCRS, Biologia Celular e Molecular Pauli, Vânia; PUCRS, Biologia Celular e Molecular Mello de Oliveira, Luciana; PUCRS, Biologia Celular e Molecular Custódio Saciara, Vasy; PUCRS, Biologia Celular e Molecular Henrich Amaral, Robson; PUCRS, Biologia Celular e Molecular Guerra Simões Pires, Melissa; PUCRS, Biologia Celular e Molecular Dal-Pizzol, Felipe; UNESC, Ciências da Saúde Fonseca Moreira, José; UFRGS, Bioquímica Behr, Guilherme; UFRGS, Bioquímica Reichel, Carlos; PUCRS, Laboratório Central de Anatomia Patológica Rodrigues de Oliveira, Jarbas; PUCRS, Biologia Celular e Molecular
Descriptor:	Acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury

