



# POTENCIALIZAÇÃO POR LPS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA BRADICININA NO MODELO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR EM CAMUNDONGOS

JULIA ELISABETT KLOCOSKI BOLSONELLO <sup>1,2\*</sup>, LUCAS SIGNORI <sup>2,3</sup>,  
CAROLINE BALDESSAR DALMOLIN <sup>2,4</sup>, DANIELA HEMSING <sup>2,5</sup>, VALFREDO  
SCHLEMPER<sup>2,6</sup>

## 1 Introdução

Após a clivagem de cininogênios por proteases plasmáticas são formados peptídeos ativos, denominados cininas, sendo bradiginina (BK) e lisil-bradiginina, que participam da regulação de processos inflamatórios e vasculares. A BK liga-se a dois subtipos de receptores situados nas membranas celulares acoplados à proteína G e Gαq/11: o B1, induzido, ou seja, tem sua expressão aumentada em por citocinas e danos teciduais e o B2, constitutivo, ativado em processos fisiológicos (RANG et al., 2016). Além de causar aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, a BK tem ação nociceptiva, atua na contração dos músculos lisos, secreção de muco e reflexo de tosse nas vias aéreas (BARNES, 1992; RANG et al., 2016). Assim, pacientes asmáticos apresentaram altos níveis de BK em lavado broncoalveolar, por isso, a BK é utilizada para mimetizar o processo inflamatório em modelos experimentais de asma (LANDGRAF; SIROIS; JANCAR, 2003).

## 2 Objetivos

Investigar as ações da bradiginina nos processos inflamatórios crônicos das vias aéreas de camundongos, que receberam lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) de *Escherichia coli*, utilizando os antagonistas Des-Arg9-[Leu8]-BK e HOE-140 (icatibanto), dos receptores B1 e B2 respectivamente, avaliando a migração celular através do lavado broncoalveolar (BAL).

## 3 Metodologia

1 Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: bolsonellojulia@gmail.com

2 Grupo de Pesquisa: Sanidade Animal – Sanimal.

3 Acadêmico de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

4 Farmacêutica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS), Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

5 Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

6 Professor Adjunto, Doutor, Médico veterinário, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, Orientador.



A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), protocolo nº 23205.001973/2017-11. Foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem Balb/c, com peso entre 25 e 35 gramas e cerca de 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central da UFFS - *Campus* Realeza, criados em sistema fechado de racks ventiladas, ciclo de luz claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade do ar entre 60-80%, alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram transportados ao laboratório de pesquisa 24 horas antes do início dos experimentos e o alimento foi retirado 12 horas antes do início dos protocolos, mantendo-se dieta hídrica.

O protocolo experimental baseou-se na divisão dos animais em cinco grupos (seis animais em cada), conforme a seguir: 1) Controle negativo: animais submetidos à nebulização de 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS), durante 3 minutos. 2) Controle bradicinina (BK): animais que receberam, por nebulização, 5 mL de BK (10 nMol/mL), durante 3 minutos. 3) LPS + BK: animais tratados com LPS, na dose de 0,2 mL (20  $\mu\text{g}$ ), via intraperitoneal, 24 horas antes da nebulização. Para a nebulização, estes receberam 5 mL de BK (10 nMol/mL), durante 3 minutos. 4) LPS + antagonista B1 + BK: animais que receberam o LPS de acordo com o descrito no grupo 3. Após 24 horas, foram submetidos à instilação nasal do antagonista dos receptores B1, Des-Arg9-[Leu8]-BK (DALBK), na dose de 0,6  $\mu\text{l}$  (300 nMol/ml). Passados 20 minutos, realizou-se a nebulização por BK, na dose de 5 mL (10 nMol/ml), durante 3 minutos. 5) LPS + antagonista B2 + BK: animais que receberam o LPS de acordo com o descrito no grupo 3. Após 24 horas, foram submetidos à instilação nasal do HOE-140, antagonista dos receptores B2, na dose de 0,6  $\mu\text{l}$  (10 nMol/mL). Após 20 minutos, os animais foram submetidos à nebulização por BK, na dose de 5 mL (10 nMol/mL), durante 3 minutos. Duas horas após a nebulização, os animais foram submetidos à eutanásia através câmara com atmosfera saturada de  $\text{CO}_2$ , seguida de realização do BAL. Esta técnica consiste na dissecação da traqueia, inserção de um cateter até a região da carina, e introdução de 1 mL de solução isotônica (PBS). A solução foi instilada e acompanhada de movimentos rítmicos de massagem na região torácica, em seguida, o fluido foi recuperado através de aspiração e acomodado em microtubos identificados. O procedimento foi realizado duas vezes em cada animal. As amostras coletadas foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* depositado no fundo foi ressuscitado em 1 mL de PBS não heparinizado. Na sequência, uma alíquota do BAL foi destinada à contagem dos leucócitos totais e outra à confecção de lâminas pelo método de sedimentação em câmaras de



Suta por 1 hora e coradas com o corante panótico simples, para a contagem diferencial celular. Os dados foram agrupados e apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias, e submetidos a análise de variância ANOVA e confrontados pelos testes de Newman-Keuls ou Dunnett se necessário. A significância estatística considerada foi  $P < 0.05$ .

#### 4 Resultados e Discussão

O grupo controle negativo apresentou a menor média de leucócitos totais ( $25800 \pm 0,20$ ), sendo esses diferenciados em linfócitos ( $71,67\% \pm 4,64$ ) e macrófagos ( $28,33\% \pm 4,64$ ). Ao comparar o grupo controle BK ( $70000 \pm 1,02$  células, estas foram distinguidas em linfócitos ( $64\% \pm 2,85$ ), macrófagos ( $31,8\% \pm 3,68$ ) e neutrófilos ( $4,2\% \pm 1,74$ )) com o controle negativo, houve um aumento de 171% no número de leucócitos totais ( $p < 0.0001$ ), devido à potente ação que a BK desempenha como mediador inflamatório.

Ao confrontar o grupo LPS + BK ( $82500 \pm 1,00$  células) com o grupo controle negativo, verificou-se um aumento de 219% no número de células recrutadas ( $p < 0.0001$ ) e, com relação ao grupo controle BK, obteve-se um aumento de 17,8%. Portanto, o LPS potencializa o efeito inflamatório que a BK ocasiona, por atuar no recrutamento de um maior número de leucócitos para o sítio inflamatório, pois, altera a permeabilidade vascular e desencadeia quimiotaxia, e ainda estimular, especialmente, receptores B1 (MOLIMARD et al., 1998). Contudo, não houve significância estatística entre o grupo LPS + BK e grupo controle BK. Em relação a diferenciação celular do grupo LPS + BK, foram encontrados macrófagos ( $79,17\% \pm 2,03$ ), linfócitos ( $16,67\% \pm 1,38$ ), neutrófilos ( $2,83\% \pm 1,89$ ), e, também, basófilos ( $0,83\% \pm 0,40$ ) e eosinófilos ( $0,50\% \pm 0,34$ ). Ao comparar esse grupo com o controle negativo, observou-se que tanto macrófagos quanto linfócitos, apresentaram um aumento extremamente significativo ( $p = 0.0001$ ).

O grupo tratado com DALBK ( $45000 \pm 0,28$  células) teve redução significativa na migração de leucócitos nas vias aéreas, sendo de 45,4%, quando comparado com os grupos LPS + BK ( $p = 0.001$ ). O grupo do antagonista B1 apresentou mais macrófagos ( $68,83\% \pm 2,94$ ) que linfócitos ( $29,33\% \pm 2,88$ ), e um baixo número de neutrófilos ( $1,17\% \pm 0,30$ ) e basófilos ( $0,67\% \pm 0,42$ ). Entretanto, assim como o grupo LPS + BK, tanto macrófagos quanto linfócitos, ao comparar com o controle negativo, tiveram um aumento extremamente significativo ( $p = 0.0001$ ).

O grupo tratado com antagonista B2 (HOE-140) ( $58300 \pm 0,35$  células) apresentou



diminuição de 29,9% no número total de leucócitos ao analisar com o grupo LPS + BK ( $p < 0.1$ ). Já em relação a contagem diferencial apresentou macrófagos ( $52,83\% \pm 7,36$ ), linfócitos ( $43,00\% \pm 7,81$ ), neutrófilos ( $2,33\% \pm 0,55$ ) e basófilos ( $1,83\% \pm 0,94$ ). Esse grupo, ao ser comparado com o grupo controle negativo, demonstrou-se com notável significância estatística ( $p = 0.001$ ), tanto para macrófagos, quanto para linfócitos. Neutrófilos, basófilos e eosinófilos, foram visualizados esporadicamente e não apresentaram significância estatística. Portanto, verificou-se uma ação anti-inflamatória do antagonista seletivo do receptor B1, ou seja, a redução do recrutamento celular para as vias aéreas, a qual foi mais robusta quando comparada ao antagonista B2, mas, ambos suprimiram a migração leucocitária. Assim, salienta-se a ação anti-inflamatória dos antagonistas da BK, uma vez que, ligam-se aos receptores e bloqueiam os sítios de ligação, impedindo, dessa forma, a adesão da BK e realização de suas ações inflamatórias, a exemplo da estimulação quimiotática.

## 5 Conclusão

Denota-se, neste estudo, em relação a migração celular nas vias respiratórias dos camundongos, um maior envolvimento dos leucócitos mononucleares. Devido à redução leucocitária no grupo tratado com antagonista dos receptores B1, pode-se sugerir que este pode caracterizar novo alvo terapêutico para doenças inflamatórias crônicas, como a asma. Porém, os antagonistas B2 perseveram como uma boa alternativa terapêutica para essas enfermidades.

## Referências

- BARNES, P. J. Bradykinin and asthma. **Thorax - Department of Thoracic Medicine, National Heart and Lung Institute**, London (England), v. 47, p. 979-983, 1992.
- LANDGRAF, R. G.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B1 and B2 selective receptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 460, n. 1, p. 75–83, 2003.
- MOLIMARD, M. et al. In vitro-induced human airway hyperresponsiveness to bradykinin. **European Respiratory Journal**, v. 12, n. 6, p. 1301–1307, 1998.
- RANG, H. P. et al. **RANG & DALE: FARMACOLOGIA**. 8a Edição. Rio de Janeiro (RJ). Elsevier, 2016.

**Palavras-chave:** receptores da bradicinina; inflamação crônica; asma; vias respiratórias.

## Financiamento

Fundação Araucária.