

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E  
FARMACOLOGIA

RAPHAEL GOMES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO ÁCIDO NICOTÍNICO E  
PELA NICOTINAMIDA SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS  
INDUZIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS EM  
CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2011

RAPHAEL GOMES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO ÁCIDO NICOTÍNICO E  
PELA NICOTINAMIDA SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS  
INDUZIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Ênfase em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. André Klein.

Belo Horizonte

2011

Ferreira, Raphael Gomes

Avaliação dos efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos inflamatórios em camundongos. [manuscrito] / Raphael Gomes Ferreira. - 2011

95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: André Klein.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

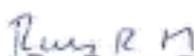
1. Nicotinamida – Teses. 2. Ácido nicotínico - Teses. 3. Inflamação - Teses. 4. Neutrófilos - Teses. 5. Zimosano – Teses. 6. Interleucina – Teses. 7. Leucotrienos - Teses. 8. Pleurisia – Teses. 9. Farmacologia – Teses. 10. Carragenina. 11. Microscopia intravital. I. Klein, André. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

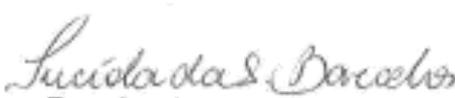
CDU: 615.356

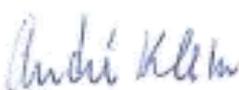
**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS PELO ÁCIDO  
NICOTINICO E PELA NICOTINAMIDA SOBRE A  
MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA POR  
DIFERENTES ESTÍMULOS INFLAMATÓRIOS EM  
CAMUNDONGOS”.**

**RAPHAEL GOMES FERREIRA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 19 de agosto de 2011, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. RENES RESENDE MACHADO**  
DEPTO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS  
FAFAR/UFMG

  
**PROFA. DRA. LUCÍOLA DA SILVA BARCELOS**  
DEPTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
ICB/UFMG

  
**PROF. DR. ANDRÉ KLEIN**  
DEPTO DE FARMACOLOGIA, ICB-UFMG - ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 19 de agosto de 2011.

Dedico o grau de mestre

Aos meus pais, Ailton Fernando Ferreira e Ruth Gomes Ferreira, e aos meus irmãos,  
Pedro Gomes Ferreira e Sarah Gomes Ferreira, pelo grande apoio e confiança  
sempre constantes.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser minha luz nos momentos de escuridão.

Ao meu orientador e amigo André Klein, sou grato pela orientação que possibilitou a realização deste trabalho e pelos conselhos, que foram além da bancada, e sem dúvidas irão me acompanhar pela vida inteira.

Ao professor Márcio Coelho, agradeço pelo apoio e incentivo e pelo exemplo de dedicação ao ensino e a ciência.

À minha mãe, Ruth Gomes Ferreira, pelo apoio que sempre me deu. Sem você eu não teria chegado até aqui.

Ao meu pai, Ailton Fernando Ferreira, que sempre foi um exemplo de trabalho, honestidade e dedicação.

Aos meus irmãos Pedro e Sarah, obrigado pela companhia, amizade, carinho e principalmente, paciência nos momentos de estresse.

A todos os meus tios, tias, primos, primas e vovó, pois com vocês aprendi como a família é importante na formação do caráter de uma pessoa. Este trabalho também é de vocês.

À professora Janetti, pelo exemplo de dedicação e amor à ciência.

Ao professor Gustavo Menezes, pelo apoio e incentivo para que este trabalho fosse concretizado.

À minha namorada Viviane, pelo amor e dedicação, por dividir os momentos bons e ruins, por estar sempre presente me levando a sonhar mais alto.

Aos amigos do biotério (CEBIO), Elmo e Gilmar, exemplos de dedicação e profissionalismo no atendimento e fornecimento dos animais.

Ao mestrando Pedro Elias, obrigado pela ajuda no preparo das lâminas histológicas.

Aos amigos do biotério da farmacologia, Jorge, Rinaldo e Wellington, que sempre prestaram o suporte necessário para a realização desse trabalho.

As secretárias da pós-graduação, Célia, Cintya e Nilda, pelo suporte técnico e conselhos indispensáveis para a realização deste trabalho, muito obrigado.

Aos amigos do meu laboratório, Webster, Lindisley, Tamires, Paula, Natália, Samuel, Francilene, Gabriela e Ana Clara. A presença de vocês deixou minha caminhada mais fácil e de certa forma vocês são a minha família.

À quase orientadora Adriana Godin, pelas palavras de sabedoria, amizade, força e exemplo profissional. Sem você eu não teria chegado.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia, Leandro, Elias, Wallace, Marcela, João, Batista e Adelaide. Obrigado pelo acolhimento e apoio.

Aos amigos da pós-graduação, Ana Flávia, Pedro Gobira, Lucas, Thércia, Ariadne, Rogério, Dalton, Celso, Ana Cândida, Fernanda, Luiz Felipe, Matheus, Kátia, Luciana, Denise, Geovanni, Luciana, Paulo, Rosária, Dani. Obrigado pelas festas, conselhos, carinho e força.

Aos amigos de graduação Orozimbo, Gustavo Laine, Fábio Junio e Raquel, por me ajudar a chegar até aqui.

Aos amigos da República discípulos de Zinú, Pedro, Gustavo Moura, Dyonatha, Edwardes, Plínio, Marcos, Luiz Fabrício, Dyego. Sem dúvida mentes brilhantes.

Aos amigos da Semeando e da Igreja Casa de Oração, pelo apoio e carinho em todos os momentos.

A CAPES, CNPq e Fapemig, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não faças de ti um sonho a realizar. Vai”*

*Cecília Meireles*

## RESUMO

Nas últimas décadas, alguns estudos demonstraram que o ácido nicotínico (NIA) e a nicotinamida (NIC), vitaminas da família B3, além das conhecidas funções nutricionais também apresentavam propriedades anti-inflamatórias. Para melhor entender como o tratamento com essas vitaminas interfere no processo de migração celular para o foco inflamatório, camundongos Balb/c machos, com massas entre 20-25 g, foram desafiados com carragenina (CG 200 µg/cavidade-0,1 mL), zimosano (ZYM 200 µg/cavidade-0,1 mL), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub> 500 ng/cavidade-0,1 mL) ou interleucina-8 (IL-8 60 ng/cavidade-0,1 mL) para indução de pleurisia. Os animais foram tratados com NIC (250, 500 ou 1000 mg/Kg-0,2 mL, *per os*) ou NIA (150, 300 ou 600 mg/Kg-0,2 mL, *per os*) 30 min antes e 1 h após o desafio com os agentes flogogênicos. Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> 4 h após o desafio, o lavado da cavidade pleural coletado, centrifugado e o precipitado utilizado para realização da contagem total e diferencial de leucócitos. O duplo tratamento com NIC (1000 mg/Kg) reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos desafiados por CG, ZYM, LTB<sub>4</sub> e IL-8. O duplo tratamento com NIA (600 mg/Kg) também reduziu a migração de neutrófilos em camundongos desafiados com CG, ZYM, LTB<sub>4</sub> e IL-8. Para avaliar a adesão e o rolamento de leucócitos, foi realizado um protocolo de microscopia intravital. Os camundongos foram tratados com NIC (1000 mg/Kg) e ou NIA (600 mg/Kg), 30 min antes e 1 h após desafio com CG (100 µg/cavidade) injetada diretamente na bolsa escrotal. Quatro horas após o desafio com CG, foram coletadas imagens da microcirculação do músculo cremaster com auxílio de um microscópio de fluorescência. A análise das imagens revelou que o duplo tratamento com NIC ou NIA reduziu o rolamento e a adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Após a captação das imagens os animais foram eutanasiados, o músculo cremaster foi coletado e utilizado para confecção de lâminas para análise histológica. A análise qualitativa das lâminas revelou menor número de leucócitos na região intersticial nos animais tratados com NIC e NIA em relação aos animais não tratados. Concluindo, os resultados demonstram que o tratamento com NIC ou NIA reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos desafiados com diferentes agentes flogogênicos. O tratamento com as vitaminas também reduziu o rolamento e a adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster, o que pode justificar, pelo menos em parte, a redução do número de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos desafiados com diferentes agentes flogogênicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** nicotinamida, ácido nicotínico, inflamação, neutrófilos, carragenina, zimosano, interleucina, leucotrieno, microscopia intravital, pleurisia.

## ABSTRACT

During the last decades some studies have shown that nicotinic acid (NIA) and nicotinamide (NIC), vitamins of the B3 family, besides the known nutritional functions, have antiinflammatory properties. Therefore, to better understand how these vitamins can interfere with the process of cell migration to inflamed focus, male Balb/c mice, weighing 20-25 g, were challenged with carrageenan (200 µg/cavity-0.1 ml), zymosan (ZYM 200 µg/cavity-0.1 ml), leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub> 500 ng/cavity-0.1 mL) or interleukin-8 (IL-8 60 ng/cavity-0.1 mL) to pleurisy induction. These mice were treated with NIC (250, 500, 1000 mg/Kg-0.2 mL, *per os*) or NIA (150, 300, 600 mg/Kg-0.2 mL, *per os*) 30 min before and 1 h after the challenge with the inflammatory agents. Four hours after the challenge, the animals were euthanized in CO<sub>2</sub> chamber, the lavage of pleural cavity was collected, centrifuged and the precipitate was used to perform the total and differential counting of leukocytes. The double treatment with NIC (1000 mg/Kg) reduced the migration of neutrophils to pleural cavity of mice challenged with CG, ZYM, LTB<sub>4</sub> e IL-8. The double treatment with NIA (600 mg/Kg) also reduced the neutrophil migration in mice challenged with CG, ZYM, LTB<sub>4</sub> and IL-8. To assess the profile of the adhesion and rolling of leukocyte, a protocol of intravital microscopy was performed. The mice were treated with NIC (1000 mg/Kg) or NIA (600 mg/Kg), 30 min before and 1 h after the challenge with CG (100 µg/0.1 mL) injected directly into the scrotum. Four hours after the challenge with CG, images were collected from microcirculation of cremaster muscle with the aid of a fluorescence microscope. The analysis of images revealed that the double treatment with NIC or NIA reduced the process of rolling and adhesion of leukocytes on microcirculation of the cremaster muscle of mice. In addition, after the capture of images, the mice were euthanized, the cremaster muscle was collected and used for histological analysis. The qualitative analysis of the slides revealed a lower number of leukocytes in the interstitial region of mice treated with NIC and NIA compared to untreated mice. In conclusion, the results demonstrated that the treatment with NIC and NIA reduced the neutrophil migration to pleural cavity of mice challenged with different inflammatory agents. The treatment with B3 vitamins also reduced rolling and adhesion of leukocytes on microcirculation of cremaster muscle, so the inhibition on the neutrophil migration to pleural cavity of the mice could be explained, in part by the reduction of leukocyte rolling and adhesion induced by NIC e NIA.

**KEYWORDS:** nicotinamide, nicotinic acid, inflammation, neutrophils, carrageenan, zymosan, interleukin, leukotriene, intravital microscopy, pleurisy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas químicas do ácido nicotínico e da nicotinamida .....	22
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas das coenzimas NAD <sup>+</sup> (A) e NADP <sup>+</sup> (B).....	23
<b>Figura 3.</b> Escala temporal para o tratamento dos camundongos com ácido nicotínico ou nicotinamida em pleurisia induzida por carragenina, zimosano, leucotrieno B <sub>4</sub> ou Interleucina-8.....	33
<b>Figura 4.</b> Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes doses de carragenina (20, 200, 600 µg/0,1 mL).....	40
<b>Figura 5.</b> Efeito induzido pelo pré-tratamento com nicotinamida (250, 500 ou 1000mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) .....	41
<b>Figura 6.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de carragenina(200 µg/0,1 mL) .....	43
<b>Figura 7.</b> Efeito induzido pela nicotinamida(1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200µg/0,1 mL) em diferentes momentos.....	45
<b>Figura 8.</b> Efeito induzido pelo pós-tratamento com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1mL) .....	47
<b>Figura 9.</b> Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes doses de zimosano (20, 200 ou 600 µg/0,1mL) .....	48
<b>Figura 10.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL)sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) .....	50
<b>Figura 11.</b> Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) em diferentes momentos.....	52
<b>Figura 12.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de LTB <sub>4</sub> (500 ng/0,1 mL).....	55
<b>Figura 13.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de IL-8 (60 ng/0,1 mL).....	56

<b>Figura 14.</b> Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL)..sobre o rolamento de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzida pela administração local de carragenina (100 µg/0,1 mL).....	58
<b>Figura 15.</b> Efeito induzido pela nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzida pela administração local de carragenina (100 µg/0,1 mL).....	59
<b>Figura 16.</b> Cortes histológicos do músculo cremaster de camundongos desafiados com carragenina (100 µg/0,1 mL) e tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) .....	60
<b>Figura 17.</b> Efeito induzido pelo pré-tratamento com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL).....	61
<b>Figura 18.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de carragenina (200 µg/0,1 mL) .....	63
<b>Figura 19.</b> Efeito induzido pelo ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) em diferentes momentos.....	65
<b>Figura 20.</b> Efeito induzido pelo pós-tratamento com ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) .....	67
<b>Figura 21.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) .....	69
<b>Figura 22.</b> Efeito induzido pelo ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) em diferentes momentos.....	71
<b>Figura 23.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL)sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de LTB <sub>4</sub> (500 ng/0,1 mL).....	74
<b>Figura 24.</b> Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de IL-8 (60 ng/0,1 mL) .....	75
<b>Figura 25.</b> Efeito induzido pelo ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre o rolamento de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzido pela administração local de carragenina(100 µg/0,1 mL) .....	77

**Figura 26.** Efeito induzido pelo ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzida pela administração local de carragenina (100 µg/0,1 mL)..... 78

**Figura 27.** Cortes histológicos do músculo cremaster de camundongos desafiados com carragenina (100 µg/0,1 mL) e tratados com ácido nicotínico (600mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) ..... 79

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Leucócitos presentes na cavidade pleural 4 h após administração i.pl. de diferentes doses de carragenina (20, 200 ou 600 µg/0,1 mL) ..... 40
- Tabela 2.** Efeito induzido pelo pré-tratamento com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL)..... 41
- Tabela 3.** Efeito induzido pelo pré- e pós-tratamentos com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) ..... 43
- Tabela 4.** Ação inibitória da nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL)..... 46
- Tabela 5.** Efeito induzido pelo pós-tratamento com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) ..... 47
- Tabela 6.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 h após administração i.pl. de diferentes doses de zimosano (20, 200 ou 600 µg/0,1 mL).... 49
- Tabela 7.** Efeito induzido pelo pré e pós-tratamento com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) ..... 50
- Tabela 8.** Efeito induzido pela nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) ..... 53
- Tabela 9.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) 4 h após administração i.pl de LTB<sub>4</sub> (500 ng/0,1 mL) ..... 55
- Tabela 10.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) 4 h após administração i.pl. de interleucina-8 (60 ng/0,1mL) ..... 57
- Tabela 11.** Efeito induzido pelo pré-tratamento com ácido nicotínico ( 150, 300 ou 600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) ..... 62
- Tabela 12.** Efeito induzido pelo pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL) ..... 63

<b>Tabela 13.</b> Ação inibitória do ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL).....	66
<b>Tabela 14.</b> Efeito induzido pelo pós-tratamento com ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina (200 µg/0,1 mL).....	67
<b>Tabela 15.</b> Efeito induzido pelo pré- e pós-tratamento com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL).....	69
<b>Tabela 16.</b> Efeito induzido pelo ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano (200 µg/0,1 mL) .....	72
<b>Tabela 17.</b> Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) 4 h após administração i.pl de LTB <sub>4</sub> (500 ng/0,1 mL).....	74
<b>Tabela 18.</b> Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg; p.o. - 0,2 mL) 4 h após administração i.pl. de interleucina-8 (60 ng/0,1 mL).....	76

## LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%(p/v)	percentual peso por volume
%(v/v)	percentual volume por volume
µg	micrograma ( $10^{-6}$ g)
3-AB	Aminobenzamida
3-CPA	3-Cloroprocaínamida
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância ( <i>analysis of variance</i> )
ATM	atmosfera
BSA	Albumina de soro bovino
CG	carragenina
CMC	Carboximetilcelulose
ELISA	Ensaio imuno-sorvente por enzima ligada ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
EPM	Erro padrão da Média
<i>et al</i>	e outros (do latim <i>Et alii</i> )
g	gramas
G	gravidade
h	hora
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intrapleural
i.sc	intra-escrotal
i.v.	intravascular
IL	interleucina
Kg	Kilograma
L	litro
LT	leucotrieno
LTB <sub>4</sub>	leucotrieno B <sub>4</sub>
MCA	Metoclopramida
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
min	minuto
mL	mililitro ( $10^{-3}$ L)
MLCK	Miosina Endotelial de Cadeia Leve
n	número de animais experimentais
Nampt	Nicotinamida fororibosiltransferase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng	nanograma ( $10^{-9}$ g)
NIA	ácido nicotínico
NIC	nicotinamida
NMN	Nicotinamida mononucleotídeo
°C	graus Celsius ou Centígrados
<i>p.o.</i>	<i>per os</i>
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PARP-1	Poli(ADP-ribose) polimerase-1
PBS	tampão fosfato salino
Pg	picograma ( $10^{-12}$ g)
PG	prostaglandina
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RPM	rotações por minuto
s	segundo
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ZYM	Zimosano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 A inflamação e o recrutamento celular .....	17
1.2 Vitaminas do complexo B: O ácido nicotínico e a nicotinamida em um contexto inflamatório. ....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3 OBJETIVO</b> .....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Drogas e reagentes .....	30
4.3 Solução salina (0,9%).....	31
4.4 Preparo da suspensão de carboximetilcelulose (CMC) .....	31
4.5 Preparo das suspensões da nicotinamida e do ácido nicotínico .....	31
4.6 Preparo da solução de albumina bovina (BSA).....	31
4.7 Preparo da solução de PBS .....	32
4.8 Solução anestésica .....	32
4.9 Preparo da suspensão de carragenina (0,2%) .....	32
4.10 Preparo da suspensão de zimosano (0,2%) .....	32
4.11 Preparo da solução de LTB <sub>4</sub> .....	33
4.12 Preparo da solução de IL-8 .....	33
4.13 Preparo da solução de lise de hemácias (TurK).....	33
4.14 Tratamentos dos animais com ácido nicotínico ou nicotinamida .....	33
4.15 Pleurisia induzida por diferentes agentes flogogênicos em camundongos ..	34
4.16 Método para coloração de lâminas para contagem de leucócitos .....	35

4.17 Preparação do músculo cremaster de camundongos para estudos com microscopia intravital.....	35
4.18 Obtenção e análise das imagens obtidas por meio da técnica de microscopia intravital.....	36
4.19 Confeção de lâminas histológicas .....	37
4.20 Análise estatística .....	38
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1 Nicotinamida.....	41
5.2 Ácido nicotínico .....	61
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>88</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ANEXO.....	94
Anexo 1 – Certificado de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal da UFMG (CETEA).....	95

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A inflamação e o recrutamento celular

A inflamação é uma resposta de tecidos vascularizados a estímulos internos e externos que podem apresentar natureza química, física ou biológica. Diferentes formas de agressão levam ao surgimento de sinais e sintomas específicos no organismo com o objetivo de restaurar a homeostasia perdida (Muller, 2002). Celsus, no séc. I d.C, foi quem primeiro descreveu seus principais sinais e sintomas: *rubor*, *tumor*, *calor* e *dolor* (eritema, edema, calor e dor). Posteriormente, Virchow adicionou outra alteração, a *functio laesa* (perda de função) (Collins, 1999).

Desde então, muitas descobertas foram feitas demonstrando que a resposta inflamatória é um processo complexo que envolve alterações da permeabilidade vascular (Issekutz *et al.*, 1988), ativação de sistemas plasmáticos específicos, como o sistema das cininas e do complemento (Imai *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 2010), além da migração de leucócitos para o local da lesão (Kim *et al.*, 2000).

Mediadores solúveis como histamina e serotonina, além de mediadores lipídicos como a prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>, são liberados por mastócitos presentes no tecido lesionado, sendo responsáveis pelas alterações vasculares que levarão ao extravasamento de plasma e proteínas dos vasos sanguíneos para a região intersticial (Issekutz *et al.*, 1988).

O aumento da permeabilidade vascular também irá possibilitar que proteínas solúveis encontradas no plasma e conhecidas por formar o sistema do complemento cheguem à região intersticial e sejam ativadas. A ativação do complemento leva a uma cascata de eventos bioquímicos com a ativação em cadeia de várias enzimas, sendo que algumas estão envolvidas com o desenvolvimento da resposta inflamatória. Por exemplo, a proteína C3a é conhecida por estimular a liberação de histamina, enquanto que a proteína C3b é capaz de ativar macrófagos, aumentando a sua capacidade fagocítica e a produção de citocinas inflamatórias. A proteína C5a é um fator quimiotático para leucócitos e a C5b ativa uma sequência de reações que irão terminar com a ativação de C9, proteína capaz de formar poros na membrana de bactérias, provocando sua lise (Peng *et al.*, 2009).

Além do aumento da permeabilidade vascular e da ativação do complemento, a resposta inflamatória depende da ativação de vias específicas de sinalização em diferentes células como macrófagos ou células dendríticas, estimulando a produção

de importantes citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos como PGs, leucotrienos (LTs) e o fator de ativação plaquetária (PAF) que ativam os leucócitos e as células do endotélio vascular.

A importância das PG no desenvolvimento da resposta inflamatória pode ser comprovada diante da importância terapêutica dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), que inibem a enzima ciclooxigenase (COX), responsável pela síntese das PGs (Vane, 1971).

Entre os LTs, destaca-se o LTB<sub>4</sub>, agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleares e monócitos (Martel-Pelletier *et al.*, 2003). O LTB<sub>4</sub> atua sobre neutrófilos promovendo os processos de adesão e migração através das células do endotélio vascular, contribuindo para o processo de diapedese (Byrum *et al.*, 1999). Além disso, o LTB<sub>4</sub> também estimula a síntese e liberação de citocinas inflamatórias, colaborando para a ampliação da inflamação (Chou *et al.*, 2010).

Entre os vários processos controlados pelas citocinas, os mais relevantes para o desenvolvimento da inflamação são: regulação dos eventos envolvidos com a imunidade inata e adaptativa, controle do processo de apresentação de antígenos, participação no recrutamento e ativação de leucócitos, além de regulação da expressão de moléculas de adesão (Borish *et al.*, 2003).

Uma das primeiras citocinas produzidas durante a resposta inflamatória é o fator de necrose tumoral (TNF), que pode ser encontrado na forma de duas proteínas homólogas, com funções semelhantes e produzidas principalmente por monócitos (TNF- $\alpha$ ) ou por linfócitos (TNF- $\beta$ ). A citocina TNF- $\alpha$  também pode ser produzida por outras células como neutrófilos, mastócitos e células endoteliais (Beutler *et al.*, 1989). Além de TNF- $\alpha$ , os monócitos podem produzir outras citocinas como as interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 e IL-18 que podem ativar outros monócitos, aumentar a produção de citocinas, estimular a migração de leucócitos para o local da lesão, além de contribuir para a resolução do processo inflamatório (Borish *et al.*, 2003).

Compreender como a produção de citocinas pode modular a resposta inflamatória é complicado, pois em muitos momentos as citocinas têm um papel duplo, podendo atuar como pró- ou anti-inflamatórias. A citocina IL-6 representa um bom exemplo, uma vez que, na presença de IL-1 regula o desenvolvimento da febre e a produção de algumas proteínas de fase aguda, as quais estão comprometidas com o desenvolvimento do quadro inflamatório. Por outro lado, a citocina também

exerce efeito anti-inflamatório ao inibir a produção de IL-1 e TNF, o que constitui um exemplo de retroalimentação negativa, uma vez que a produção de IL-6 é estimulada por IL-1 ou TNF no início da resposta inflamatória (Borish *et al.*, 2003).

Outra importante citocina é a IL-8, potente agente quimiotático e ativador de neutrófilos e células endoteliais. Essa citocina estimula a desgranulação de neutrófilos, além de estimular a adesão dessas células ao endotélio vascular. Uma produção excessiva de IL-8 induz migração excessiva de neutrófilos para o foco inflamatório, seguida da liberação de seu conteúdo enzimático. Esse é o principal mecanismo fisiopatológico de doenças como psoríase, artrite reumatoide, fibrose pulmonar idiopática, doença inflamatória intestinal, além do choque séptico (Yang *et al.*, 1999).

Os eventos mencionados até aqui irão contribuir de forma direta ou indireta para a passagem dos leucócitos da circulação para a região intersticial, rumo ao foco da lesão, a fim de eliminar patógenos e resíduos celulares e iniciar o reparo tecidual (Granger *et al.*, 1994). Esse processo, também conhecido como diapedese, é didaticamente dividido em quatro etapas descritas como uma sequência de eventos na qual cada fase favorece a ocorrência da etapa subsequente (Butcher, 1991).

A primeira etapa é caracterizada pelo rolamento dos leucócitos sobre a superfície do endotélio vascular, mediado por moléculas específicas denominadas selectinas (Rosen, 1993). Essas moléculas são expressas principalmente pelas células do endotélio vascular, apresentam natureza protéica e têm como principal função proporcionar interações de pouca intensidade entre os leucócitos e o endotélio vascular (Rosen, 1993). As várias moléculas que compõem a família das selectinas foram divididas em três grupos, a saber: selectina-E, presente em grânulos localizados no citoplasma celular das células endoteliais e expressa apenas em condições inflamatórias; a selectina-L, presente na membrana celular de leucócitos e a selectina-P, presente em grânulos localizados em plaquetas e em células endoteliais, sendo que a exocitose desses grânulos para a membrana celular pode ser estimulada pela histamina liberada no início da resposta inflamatória (Muller, 2002).

A segunda etapa é caracterizada pela ativação dos leucócitos, o que ocorre, principalmente, por meio do simples contato entre essas células e o endotélio

vascular ou pela ação das citocinas liberadas durante o processo inflamatório (Cook-Mills *et al.*, 2005; Wittchen, 2009).

Na terceira etapa, ocorre a adesão dos leucócitos a pontos específicos do endotélio vascular, mediado por moléculas específicas denominadas integrinas. Essas moléculas são receptores heterodiméricos, presentes na membrana dos leucócitos e formados pela união de uma cadeia  $\alpha$  e outra  $\beta$ . Os leucócitos possuem principalmente integrinas da família  $\beta_2$ , também conhecidas como integrinas específicas para leucócitos ou CD18. A subunidade  $\beta_2$  pode se ligar com as subunidades  $\alpha_L$  (CD11a) ou com a subunidade  $\alpha_M$  (CD11b). A união dos domínios  $\alpha_L$  e  $\alpha_M$  com o domínio  $\beta_2$  irá originar as integrinas  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1) e  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1). Os leucócitos também podem expressar integrinas da família  $\beta_1$  como a  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) e a  $\alpha_4\beta_7$  (LPAM-1) (Springer, 1994; Muller, 2002).

As integrinas possuem ligantes específicos localizados na membrana das células endoteliais. Entre as principais moléculas destaca-se a Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1), que reconhece a integrina LFA-1 e a Molécula de Adesão Celular Vascular (VCAM-1), que reconhece a integrina VLA-4. Sendo assim, a interação das integrinas com seus ligantes favorece a adesão dos leucócitos às células endoteliais (Marlin *et al.*, 1987). As moléculas ICAM-1 e VCAM-1 são expressas em baixos níveis na maioria dos leitos vasculares na ausência de inflamação. Entretanto, a presença de citocinas inflamatórias estimula a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (Muller, 2002).

Na quarta etapa, ocorre a diapedese propriamente dita. Nessa etapa, os leucócitos podem atravessar o endotélio vascular por duas vias, a paracelular, em que a passagem dos leucócitos se dá por entre as células endoteliais (Shaw *et al.*, 2001) ou pela via transcelular, em que a passagem dos leucócitos se dá por dentro da célula endotelial (Feng *et al.*, 1998; Cook-Mills *et al.*, 2005). Menor porcentagem de leucócitos atravessa a parede dos vasos sanguíneos através da via transcelular quando comparado à via paracelular (Carman *et al.*, 2004), sendo que a migração transcelular ocorre principalmente nos vasos do sistema nervoso central e também pode ocorrer em tecidos inflamados (Feng *et al.*, 1998).

Após atravessar as células do endotélio vascular, os leucócitos ainda necessitam transpor a lâmina basal, formada por macromoléculas que em alguns vasos estão associadas ao pericito, fina camada de células que formam uma rede descontínua em torno do endotélio de quase todas as vênulas pós-capilares (Ley *et*

*al.*, 2007). Esse processo é estimulado por diferenças no gradiente de citocinas, presentes em maior quantidade no foco inflamado, o que estimula a migração dos leucócitos para o local da inflamação (Henkels *et al.*, 2011). A presença de regiões com lâmina basal de espessura reduzida também é considerado um fator que favorece a migração dos leucócitos (Feng *et al.*, 1998).

A migração de leucócitos para o local da lesão é um fator importante para o controle da inflamação e depende da persistência e intensidade do estímulo inflamatório. Se por um lado, a presença dos leucócitos é necessária e contribui para a resolução do processo, por outro, o excesso de infiltrado pode exacerbar a liberação de mediadores inflamatórios e provocar lesões transformando o quadro em uma doença aguda. Dessa forma, pesquisas são realizadas na tentativa de desenvolver novos fármacos que possam controlar a migração de leucócitos para os tecidos (Tavintharan *et al.*, 2007; Tavintharan *et al.*, 2009; Kempf *et al.*, 2011). Entre essas novas substâncias que vêm sendo investigadas, destacam-se as vitaminas do complexo B, que apresentam potencial em regular a produção de mediadores inflamatórios e inibir a migração de leucócitos para o foco da inflamação.

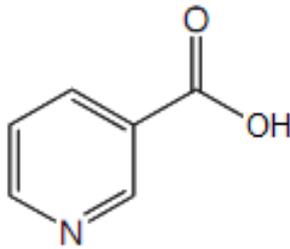
## **1.2 Vitaminas do complexo B: O ácido nicotínico e a nicotinamida em um contexto inflamatório**

As vitaminas são moléculas orgânicas de natureza química diversificada. Devem ser adquiridas em pequenas quantidades por meio da alimentação porque em alguns casos não são sintetizadas pelo organismo e em outros a capacidade de síntese não é suficiente para suprir as necessidades mínimas exigidas diariamente (Marcus e Coulston, 2001).

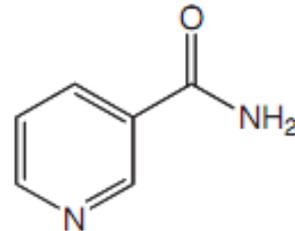
As vitaminas do complexo B compreendem um grupo de substâncias com estruturas químicas variadas, porém estão classificadas em uma mesma família, pois originalmente foram isoladas das mesmas fontes: fígado e leveduras. Tradicionalmente, o complexo vitamínico B é composto por onze elementos: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina, cianocobalamina, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, inositol, colina e o ácido para-aminobenzoico (Marcus e Coulston, 2001).

A niacina é conhecida como ácido nicotínico e também pode ser encontrada na forma de uma amida que recebe o nome de nicotinamida. Tanto o ácido nicotínico como a nicotinamida são classificados como vitamina B3 (**Figura 1**). A deficiência dessa vitamina foi identificada há décadas como responsável pelo

desenvolvimento de uma doença conhecida como pelagra, caracterizada por manifestações cutâneas, diarreia e demência (Marcus e Coulston, 2001), demonstrando a importância nutricional do ácido nicotínico e da nicotinamida.



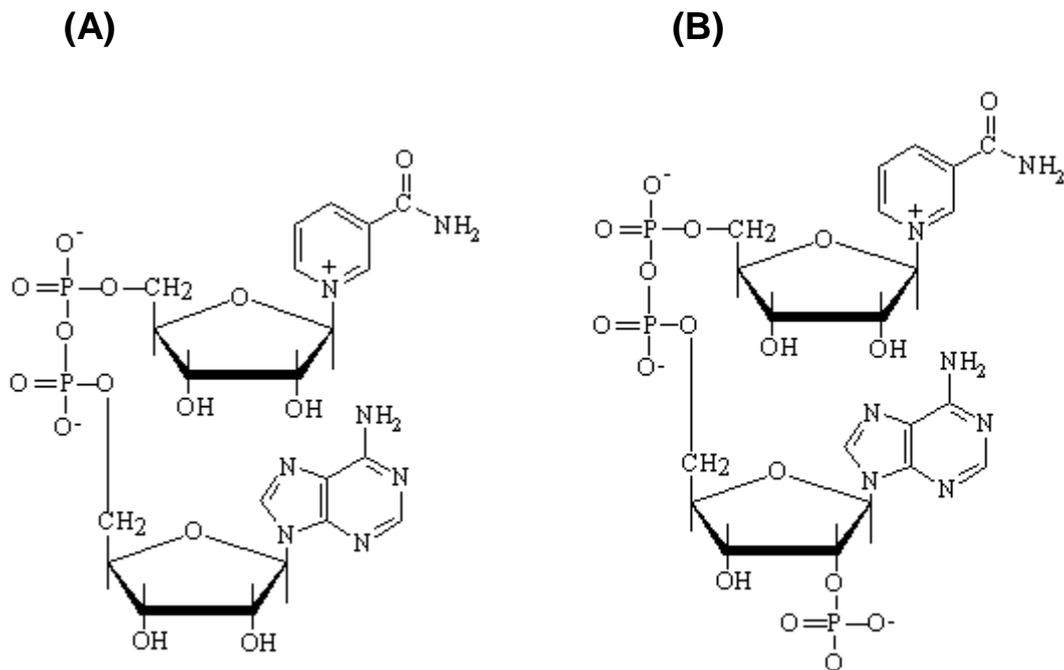
Ácido nicotínico



Nicotinamida

**Figura 1** – Estruturas químicas do ácido nicotínico e da nicotinamida.

O ácido nicotínico e a nicotinamida também participam de várias reações importantes para a manutenção da homeostase do organismo, porém, para isso é necessário que sejam metabolizados nas coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ( $\text{NADP}^+$ ) (**Figura 2**), que constituem as formas fisiologicamente ativas dessas vitaminas. As coenzimas  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  apresentam funções bioquímicas, uma vez que participam de reações de oxi-redução recebendo elétrons ou íons hidreto de substratos que sofrem oxidação em reações envolvidas no processo de respiração celular (Kirkland, 2009).



**Figura 2** – Estruturas químicas das coenzimas **(A)** NAD<sup>+</sup> e **(B)** NADP<sup>+</sup>.

Nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram a atividade anti-inflamatória do ácido nicotínico e da nicotinamida, sendo que outros estudos também demonstraram que moléculas estruturalmente análogas ao ácido nicotínico e à nicotinamida também apresentam a mesma atividade (Pero *et al.*, 1999; Ungerstedt *et al.*, 2003; Kirkland, 2009; Godin *et al.*, 2011).

O potencial anti-inflamatório de análogos da nicotinamida foi demonstrado por meio da 3-aminobenzamida (3-AB), droga pertencente ao grupo químico das benzamidas, que compartilham com a nicotinamida a propriedade de inibir uma família de enzimas conhecidas como poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), as quais estão envolvidas na regulação de vários processos biológicos. Foram identificados 16 membros dessa família, sendo que PARP-1 é o membro mais bem caracterizado e regula a síntese de diversas proteínas importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória. A inibição de PARP-1 reduz a migração de neutrófilos e a lesão tecidual induzidas por zimosano, pleurisia induzida por carragenina, além de sepse induzida por LPS (Hassa *et al.*, 2002).

Szabo e colaboradores (1997) demonstraram que o tratamento de camundongos com 3-AB reduziu dois importantes marcadores inflamatórios, o recrutamento de neutrófilos e a formação de edema induzidos por zimosano e

carragenina em um modelo de inflamação local. Já em um protocolo de inflamação sistêmica induzida por zimosano, o tratamento com 3-AB reduziu o recrutamento de neutrófilos e o nível de lesão pulmonar. O tratamento com esse inibidor de PARP também reduziu a transmigração de neutrófilos em vênulas pós-capilares mesentéricas de camundongos (Szabo *et al.*, 1997).

Um estudo que utilizou a nicotinamida ou seus análogos estruturais, metoclopramida (MCA) e 3-cloroprocaïnâmica (3-CPA), que também pertencem a família das benzamidas, demonstrou a atividade antiinflamatória dessas moléculas. Assim, o tratamento com nicotinamida, MCA ou 3-CPA reduziu de maneira dose-dependente a produção de TNF- $\alpha$  induzida pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS) *in vivo* (Pero *et al.*, 1999). Além disso, o tratamento com MCA e ou 3-CPA reduziu a formação de edema no pulmão de ratos desafiados com sephadex, um polissacarídeo de alta massa molecular e conhecido por estimular a liberação de PAF e serotonina (Francischi *et al.*, 1996; Pero *et al.*, 1999).

O tratamento com 3-CPA também reduziu a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 induzida pelo desafio com LPS em monócitos humanos *in vitro* (linhagem de célula imortalizada THP-1) (Pero *et al.*, 1999). Já em outra linhagem de células humanas imortalizadas (células *HeLa*) estimuladas com radiação a fim de provocar lesão no DNA, o tratamento com MCA reduziu a ativação de NF- $\kappa$ B, importante fator de transcrição celular, envolvido na expressão de genes relacionados às respostas inflamatória e imune, incluindo a expressão de citocinas, moléculas de adesão, fatores do complemento, regulação do processo de apoptose, além de uma variedade de receptores que participam da resposta imunológica (Karin *et al.*, 2004), sinalizando um possível envolvimento desse fator de transcrição na atividade anti-inflamatória da metoclopramida (Pero *et al.*, 1999).

Outro grupo de pesquisadores, utilizando leucócitos purificados a partir de sangue humano total e estimulados por 2 h com LPS, demonstraram que a incubação com nicotinamida reduziu de forma concentração dependente a concentração intracelular de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Ungerstedt *et al.*, 2003). O grupo também avaliou se o efeito inibitório da nicotinamida sobre a síntese de citocinas inflamatórias estava relacionado à inibição da enzima PARP. Para isso, leucócitos humanos foram incubados com LPS e tratados com nicotinamida ou 6(5H)fenantridiona, um inibidor específico da enzima PARP. Tanto a nicotinamida

quanto o inibidor específico induziram redução concentração dependente da atividade enzimática da PARP, porém o tratamento com o inibidor não reduziu a produção das citocinas IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$ . Dessa forma, a atividade inibitória da nicotinamida parece não se dever ao seu potencial em inibir a enzima PARP (Ungerstedt *et al.*, 2003).

A atividade anti-inflamatória do ácido nicotínico também vem sendo estudada. Nesse contexto, foi identificado um receptor acoplado à proteína G, ativado pelo ácido nicotínico e localizado na membrana de neutrófilos. O receptor foi denominado GPR109A e, uma vez ativado, acelerou o processo de apoptose de neutrófilos *in vitro*, abrindo a perspectiva para a utilização do ácido nicotínico como regulador do acúmulo de células inflamatórias no local da lesão. A apoptose de neutrófilos induzida pelo ácido nicotínico foi revertida pela adição de cAMP permeável às células presentes no meio de cultura, sugerindo que baixas concentrações de cAMP medeiam esse efeito (Kostylina *et al.*, 2008).

O ácido nicotínico também se mostrou útil no tratamento da aterosclerose, doença inflamatória crônica, pois reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pela angiotensina II, a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$ , a expressão e a concentração da molécula VCAM-1, importante no processo de adesão de leucócitos ao endotélio vascular, a secreção da citocina proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1) e a adesão de neutrófilos à células do endotélio da artéria aorta de humanos (HAEC) (Ganji *et al.*, 2009).

Em um modelo de inflamação pulmonar crônica induzida por LPS, o ácido nicotínico reduziu o edema pulmonar, a concentração de albumina presente no lavado pleural e o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar de cobaias. Outro parâmetro avaliado foi a concentração da coenzima NAD<sup>+</sup> no tecido pulmonar dos animais tratados ou não com o ácido nicotínico. Os resultados demonstraram que, em relação aos controles, que não foram tratados com LPS ou ácido nicotínico, os animais desafiados com LPS apresentaram concentração de NAD<sup>+</sup> reduzida, enquanto que os animais desafiados com LPS e tratados com ácido nicotínico, apresentavam concentração de NAD<sup>+</sup> aumentada, sinalizando uma possível participação da coenzima NAD<sup>+</sup> nos efeitos anti-inflamatórios dessa vitamina (Nagai *et al.*, 1994).

Os exemplos da atividade anti-inflamatória do ácido nicotínico e da nicotinamida, associados às evidências de que  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  são intermediários dessa atividade, fizeram com que  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  deixassem de ser vistas apenas como participantes de reações de oxi-redução, importantes para o metabolismo energético celular (Rechsteiner *et al.*, 1976).

A síntese celular de  $\text{NAD}^+$  a partir da nicotinamida é realizada principalmente por uma enzima conhecida como nicotinamida fosforibosiltransferase (Nampt) (Revollo *et al.*, 2004), sendo que elevada expressão dessa enzima foi observada em células do sistema imune, reforçando a ideia da participação da coenzima na regulação da resposta inflamatória (Luk *et al.*, 2008).

Buscando avaliar a relação entre o metabolismo de  $\text{NAD}^+$  e inflamação, Gool *et al.* (2009) demonstraram que elevadas concentrações intracelulares de  $\text{NAD}^+$  são importantes para a síntese de TNF induzida por LPS. Os experimentos foram realizados *in vitro* utilizando uma linhagem de monócitos humanos (célula imortalizada THP-1). A participação de Nampt foi avaliada por meio da utilização de um inibidor específico dessa enzima (APO8866). Foi observado que quando o inibidor era utilizado, mesmo na presença de nicotinamida, o nível intracelular de  $\text{NAD}^+$  permanecia baixo, o que prejudicou a produção de TNF e IL-6 (Van Gool *et al.*, 2009). No mesmo estudo, os autores demonstraram que a adição de nicotinamida mononucleotídeo (NMN), um intermediário na reação entre Nampt e nicotinamida ou a adição de ácido nicotínico, restauraram a capacidade das células de produzir TNF e IL-6. Os autores também identificaram que a produção de TNF via  $\text{NAD}^+$  se dá por meio da participação de Sirt-6, que pertence a uma família de enzimas dependentes de  $\text{NAD}^+$  e conhecidas como sirtuínas (Van Gool *et al.*, 2009).

A atividade das PARPs também é dependente de  $\text{NAD}^+$  (Hassa *et al.*, 2002), sendo que PARP-1 cliva moléculas de  $\text{NAD}^+$  liberando dois fragmentos: a nicotinamida e uma molécula de ADP-ribose. Vários monômeros de ADP-ribose podem ser polimerizados e ligados a aminoácidos específicos em proteínas aceptoras, também por meio de PARP-1, em um processo importante para a ativação enzimática e sinalização intracelular (Ziegler, 2000).

Vários estudos demonstraram as propriedades anti-inflamatórias do ácido nicotínico e da nicotinamida, sendo que o metabolismo dessas vitaminas leva a formação das coenzimas  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  (Kirkland, 2009), que também contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Essas coenzimas são substrato

para PARP-1, que pode atuar diretamente sobre a expressão de proteínas inflamatórias ou indiretamente regulando a atividade de NF- $\kappa$ B (Hassa *et al.*, 2002; Karin *et al.*, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA

O recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório é um evento importante para a evolução da inflamação, podendo em alguns casos, contribuir para os danos ao tecido, bem como para o agravamento da doença inflamatória. Desta forma, o desenvolvimento de drogas capazes de interferir com o recrutamento leucocitário, bem como o estudo de novas moléculas que apresentem essa atividade inibitória, pode ser útil para o tratamento de doenças cujo infiltrado celular é um componente importante. Nos últimos anos, resultados experimentais apresentados por alguns grupos, vêm sugerindo que as vitaminas do complexo B3, apresentam atividade anti-inflamatória, expandindo assim as ações destas vitaminas além de sua importância nutricional. A identificação de novas atividades para essas vitaminas, que já estão em uso, é importante, uma vez que seus parâmetros de farmacocinética e segurança já foram definidos.

Assim, embora sejam sugeridas atividades anti-inflamatórias para os componentes do complexo B3, a saber, o ácido nicotínico e a nicotinamida, não existem até o momento estudos *in vivo* conclusivos demonstrando a capacidade dessas moléculas em inibir o recrutamento celular induzido por estímulos inflamatórios.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre o recrutamento de neutrófilos induzido por diferentes estímulos inflamatórios em camundongos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- I. Avaliar os efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos em modelo de pleurisia induzida por carragenina, zimosano, LTB<sub>4</sub> ou IL-8 em camundongos;
- II. Avaliar os efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre os processos de rolamento e adesão de leucócitos, induzidos por carragenina, por meio da técnica de microscopia intravital no músculo cremaster de camundongos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c machos, com 4 a 5 semanas e massas de 25 a 30 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO), ICB, UFMG. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h, sendo que, ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizando animais foram analisados, estando de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), protocolo nº 24/2011) (**Anexo 1**).

### 4.2 Drogas e reagentes

- Nicotinamida (Sigma, EUA) - Vitamina B3;
- Ácido nicotínico (Galena, Brasil) - Vitamina B3;
- Carragenina  $\lambda$  tipo IV (Sigma, EUA) - Estímulo inflamatório;
- Zimosano A (Sigma, EUA) - Estímulo inflamatório;
- Leucotrieno (LT) B<sub>4</sub> (Cayman, EUA) - Agente quimiotático para leucócitos;
- Interleucina (IL)-8 (PeproTech, EUA) - Quimiocina pro-inflamatória;
- Rodamina 6G (Sigma, EUA) - Corante para microscopia por fluorescência;
- Solução salina 10mL (Equiplax, Brasil) - Veículo;
- PBS (Tampão fosfato salino) - Veículo;
- Carboximetilcelulose (Galena, Brasil) - Veículo;
- BSA (Calbiochem-EUA) - Albumina de soro bovino tipo V;
- BSA (Calbiochem-EUA) - Albumina de soro bovino tipo V, livre de ácidos graxos, nucleases e proteases;
- Xilazina 2% (Sespo industria e comércio-Brasil) - Sedativo, analgésico, relaxante muscular;
- Cetamina 5% (Laboratório Konig-Argentina) - Anestésico;
- Giemsa (QEEL-Química Especializada Erich Ltda - Brasil) - Corante para microscopia;
- May Grunwald (Dinâmica Contemporânea Ltda - Brasil) - Corante para microscopia;

- Violeta de Genciana (Vetec Química fina Ltda - Brasil) - Preparo de solução diluidora de leucócitos;
- Ácido acético glacial P.A (Vetec Química fina Ltda - Brasil) - Preparo de soluções;

#### **4.3 Solução salina (0,9%)**

Foi utilizada solução comercial estéril de cloreto de sódio 0,9% (p/v), comercializada em ampola plástica com volume de 10 mL. A solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) foi utilizada no preparo de outras soluções e será chamada de solução salina a fim de facilitar a escrita e entendimento do texto.

#### **4.4 Preparo da suspensão de carboximetilcelulose (CMC)**

Uma suspensão de CMC 0,5% (p/v) foi preparada em solução salina, sempre no dia anterior ao experimento. A suspensão de CMC foi utilizada como veículo para o ácido nicotínico ou para a nicotinamida.

#### **4.5 Preparo das suspensões da nicotinamida e do ácido nicotínico**

As suspensões da nicotinamida e do ácido nicotínico foram preparadas em suspensão de carboximetilcelulose 0,5% (p/v), conforme descrito no item anterior. A administração foi realizada *per os* (p.o.) em volume de 8 mL/kg. Foram testadas as doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg para nicotinamida e de 150, 300 e 600 mg/kg para o ácido nicotínico, sendo que as doses de nicotinamida 1000 mg/Kg e ácido nicotínico 600 mg/Kg foram escolhidas como doses padrão, após a construção de uma curva dose resposta.

#### **4.6 Preparo da solução de albumina bovina (BSA)**

A solução de BSA 3% (p/v) foi preparada em solução salina e congelada à temperatura de -20 °C. No dia do experimento, a solução era retirada do congelador, colocada em repouso em temperatura ambiente, sendo utilizada após descongelamento.

#### 4.7 Preparo da solução de PBS

Foi preparada uma solução tampão de PBS pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,84 mM, NaCl 0,14 M e KCl 2,68 mM).

Fosfato dibásico de sódio -----	1,15 g
Fosfato monobásico de potássio -----	250,00 mg
Cloreto de sódio -----	8,20 g
Cloreto de potássio -----	200,00 mg
Água destilada-----	1.000,00 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com solução de ácido fosfórico 0,1 M e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavagem a 120 °C, 2 ATMs durante 20 min, estando assim pronta para ser utilizada.

#### 4.8 Solução anestésica

Foi preparada solução anestésica utilizando cetamina (1,16 g/10 mL) e xilazina (2,3 g/100 mL). A diluição dos anestésicos obedeceu a proporção 4:1:5 de cetamina, xilazina e salina, respectivamente, sendo que cada animal recebeu um volume de 25-30  $\mu\text{L}$  dessa solução.

#### 4.9 Preparo da suspensão de carragenina (0,2%)

Foram preparadas suspensões de carragenina (20, 200, 600  $\mu\text{g}/0,1$  mL) em salina. Após a construção de uma curva dose resposta, a suspensão de carragenina com concentração de 200  $\mu\text{g}/0,1$  mL foi escolhida para a realização dos protocolos posteriores.

#### 4.10 Preparo da suspensão de zimosano (0,2%)

Foram preparadas suspensões de zimosano (20, 200, 600  $\mu\text{g}/0,1$  mL) em salina. Após a construção de uma curva dose resposta, a suspensão de zimosano com concentração de 200  $\mu\text{g}/0,1$  mL foi escolhida para a realização dos protocolos posteriores.

#### 4.11 Preparo da solução de LTB<sub>4</sub>

A solução de LTB<sub>4</sub> (500 ng/0,1 mL) foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de LTB<sub>4</sub> (50 µg/500 µL) em PBS. De acordo com o fabricante, LTB<sub>4</sub> é solúvel em PBS (pH 7,2) na concentração de 1 mg/mL.

#### 4.12 Preparo da solução de IL-8

A solução de IL-8 (60 ng/0,1 mL) foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de IL-8 (1 µg/1 µL) em uma solução de PBS + BSA (0,1%) livre de ácidos graxos, nucleases e proteases.

#### 4.13 Preparo da solução de lise de hemácias (TurK)

A solução de Turk obedeceu às seguintes proporções:

Violeta genciana -----	100 mg
Ácido acético glacial -----	30 mL
Água destilada -----	70 mL

O reagente violeta genciana foi adicionado sobre a solução contendo água destilada e ácido acético glacial.

#### 4.14 Tratamentos dos animais com ácido nicotínico ou nicotinamida

As doses de ácido nicotínico e nicotinamida utilizadas nos experimentos apresentados neste trabalho foram selecionadas a partir de resultados obtidos por outro grupo de pesquisa (Godin *et al.*, 2011). Para estabelecer o esquema de tratamento dos camundongos, foram realizados protocolos preliminares que demonstraram a necessidade de mais de uma administração dessas vitaminas. O ácido nicotínico e a nicotinamida apresentam curta meia vida plasmática, sendo metabolizados ou diretamente excretados na urina em poucas horas (Petrack *et al.*, 1966; Menon *et al.*, 2007). Dessa forma, os camundongos foram tratados com as vitaminas 0,5 h antes e 1 h após a injeção intrapleural de carragenina, zimosano, LTB<sub>4</sub> ou IL-8 (**Figura 3**).

Na noite que antecedeu o experimento, os animais foram deixados em restrição alimentar, uma vez que o tratamento com ácido nicotínico e nicotinamida foi feito *per os*. Todos os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> imediatamente antes da coleta do lavado para contagem de leucócitos.



**Figura 3** - Esquema representando o tratamento dos camundongos com o ácido nicotínico (NIA) ou com a nicotinamida (NIC).

#### 4.15 Pleurisia induzida por diferentes agentes flogogênicos em camundongos

Para avaliar a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, os animais foram submetidos ao tratamento com ácido nicotínico ou nicotinamida 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina, zimosano, LTB<sub>4</sub> ou IL-8. Foi construída uma curva dose resposta para carragenina (20, 200 ou 600 µg/cavidade), zimosano (20, 200 ou 600 µg/cavidade) - 0,1 mL (i.pl.), ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/kg) e nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) - 8 mL/Kg (p.o). Para os mediadores inflamatórios específicos LTB<sub>4</sub> e IL-8 foram utilizadas as doses de 500 e 60 ng/cavidade/0,1 mL, respectivamente. Em alguns protocolos, os animais foram apenas pré-tratados (1 h) ou pós-tratados (2 h) com ácido nicotínico ou nicotinamida em relação à administração de carragenina (200 µg/cavidade). Em todos os protocolos, os animais foram eutanasiados 4 h após a administração do agente inflamatório.

Para a coleta dos leucócitos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e, em seguida, tiveram a cavidade torácica aberta para a coleta do lavado pleural com 2 mL de BSA/PBS (1:100). O lavado foi centrifugado (4 °C à 100xG) por 4 min, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas com BSA (3%).

Os leucócitos recuperados após a centrifugação foram utilizados para realizar as contagens total e diferencial. Para isto, 20 µL da solução ressuspensa com BSA (3%) foram colocados em um tubo contendo 180 µL da solução de Turk e, em seguida, uma alíquota de 20 µL foi retirada e colocada em uma câmara de Neubauer (Brand) para contagem total de leucócitos em microscópio óptico. Para realizar a

contagem diferencial, 40-50  $\mu\text{L}$  da solução ressuspensa com BSA (3%), foram adicionados em um Citospin (Fanem), 100 rpm por 40 s, abastecido com lâminas de vidro. Após um intervalo para secagem, as lâminas foram coradas com soluções de Giemsa & May Grunwald e utilizadas para realização da contagem diferencial de leucócitos. O número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células por cavidade  $\times 10^3$ .

#### **4.16 Método para coloração de lâminas para contagem diferencial de leucócitos**

A coloração das lâminas foi realizada com os corantes May-Grunwald & Giemsa, sendo que a técnica combina os processos de fixação e coloração em um procedimento. Antes do início do procedimento, o corante Giemsa foi diluído na proporção de uma gota de corante para 1 mL de água destilada.

As lâminas foram colocadas sobre um suporte específico e com auxílio de uma pipeta plástica foram adicionadas aproximadamente 50 gotas do corante May-Grunwald. Após 3 min foram acrescentados aproximadamente 50 gotas de água destilada sobre as lâminas, seguido de mais 1 min de intervalo. Imediatamente após, as lâminas foram escorridas e, sem lavar, foram colocadas aproximadamente, 50 gotas do corante Giemsa. Após um intervalo de 15 min, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas em posição vertical à temperatura ambiente para secagem. As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico e o número de leucócitos encontrados foi expresso na forma de células por cavidade  $\times 10^3$ .

#### **4.17 Preparação do músculo cremaster de camundongos para estudos com microscopia intravital**

O músculo cremaster de camundongos foi utilizado para avaliar o rolamento e a adesão de leucócitos, em nível vascular, por meio da técnica de microscopia intravital. Os procedimentos experimentais foram realizados no Departamento de Morfologia, Laboratório de Imunofarmacologia.

Para a captação das imagens, os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg), nicotinamida (1000 mg/Kg) ou veículo (CMC 0,5%), 0,5 h antes e 1 h após a injeção de carragenina (100  $\mu\text{L}$ ) ou salina (0,9%). A administração da carragenina/salina foi feita diretamente na bolsa escrotal dos

animais (i.sc.). Quatro horas após o desafio com carragenina, os animais foram anestesiados com 25 a 30  $\mu$ L de uma mistura (4:1:5) de cetamina (11,6%), xilazina (2,3%) e salina. Após completa indução da anestesia, os animais foram imobilizados em uma mesa cirúrgica apropriada e uma pequena incisão foi feita na pele da bolsa escrotal, para expor o testículo direito e posteriormente, o músculo cremaster. O músculo foi cuidadosamente dissecado, sendo assim, liberado da fáscia muscular associada e cortado longitudinalmente com auxílio de um cauterizador. O testículo e o epidídimo foram separados da musculatura circulante e recolocados dentro da cavidade abdominal. O músculo foi então fixado, através de suas extremidades, com fios de algodão fino. Durante todo o procedimento cirúrgico, o tecido foi irrigado com um tampão de bicarbonato (37 °C e pH 7,4). Uma solução de rodamina 6G (0,1 mg/Kg; i.v.) foi injetada imediatamente antes da captação das imagens em um microscópio de fluorescência, Nikon Eclipse, acoplado a uma câmera digital Nikon. As imagens obtidas foram armazenadas e analisadas posteriormente.

#### **4.18 Obtenção e análise das imagens obtidas por meio da técnica de microscopia intravital**

A mesa cirúrgica com o animal anestesiado e com o músculo cremaster exposto foi posicionada em uma plataforma aquecida e um aumento de 20 vezes para lente objetiva e de 10 vezes para a lente ocular foi selecionado. Foi padronizado que os primeiros 5 min de análise seriam desprezados, a fim de reduzir possíveis alterações na microcirculação induzidas pelo procedimento cirúrgico. Após o intervalo de 5 min, vênulas retilíneas com diâmetro de 24 a 40  $\mu$ m foram escolhidas para a captação das imagens. Foram realizadas três filmagens com duração de 1 min para cada animal. Sempre que possível, diferentes pontos da mesma vênula foram filmados, a fim de reduzir a variabilidade.

A fim de determinar quais leucócitos estavam rolando ou aderidos, foram estabelecidos alguns parâmetros. Leucócitos em rolamento foram definidos como aqueles que se movem com uma velocidade menor do que aquela das hemácias dentro do fluxo observado, em um ponto do vaso que foi pré-determinado pelo observador, por minuto. Para definir quais leucócitos estavam aderidos, foi estabelecido que apenas células que permaneceram fixas no endotélio vascular por pelo menos 30 s deveriam ser consideradas. Também foi estabelecido que deveriam

ser contados apenas leucócitos aderidos em um seguimento de vênula com 100  $\mu\text{m}$  de comprimento.

Para avaliar de forma qualitativa o número de leucócitos que migraram para a região intersticial, o cremaster dos animais foi recolhido e utilizado para confecção de lâminas histológicas.

#### **4.19 Confecção das lâminas histológicas**

As lâminas foram preparadas com fatias do músculo cremaster retirado de camundongos Balb/c, previamente anestesiados para a captação das imagens em microscópio de fluorescência. Os animais foram eutanasiados após a retirada do tecido.

Após ser coletado, o tecido muscular foi colocado em solução de formol e PBS (3,7%) por pelo menos 48 h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções de álcool etílico de concentrações crescentes, banhadas em xilol e incluídas em blocos de parafina histológica. A partir dos blocos, cortes de 5  $\mu\text{m}$  foram obtidos utilizando um micrótomo (Microm) e coletados em lâminas histológicas, sendo em seguida, corados. Para o procedimento de coloração dos cortes, foi necessário a remoção do resíduo de parafina, clarificação das amostras com xilol e hidratação em soluções decrescentes de álcool etílico. Feito isto, os cortes foram corados com soluções de hematoxilina & eosina (HE), novamente desidratados com soluções crescentes de álcool e banhados em xilol até o momento da montagem da lamínula, o que foi feito com uso de resina Entellan.

Com o objetivo de avaliar, qualitativamente, o infiltrado de células inflamatórias, os cortes foram analisados com auxílio de um microscópio óptico e registros fotográficos foram feitos (aumentos de 10x e 20x). Cada corte foi fotografado em pelo menos três campos, sendo apenas uma imagem selecionada para fins de comparação entre grupos submetidos ou não ao tratamento com ácido nicotínico ou nicotinamida. Toda a preparação do material histológico foi realizada no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

#### **4.20 Análises estatísticas**

A construção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas *GraphPad Prism 5* e *SigmaStat 3.5*. Os dados foram analisados por meio da análise de variância simples, *one-way* ANOVA, seguidas pelo teste Bonferroni, que compara todos os grupos experimentais entre si. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e comparados com os resultados dos grupos controles. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

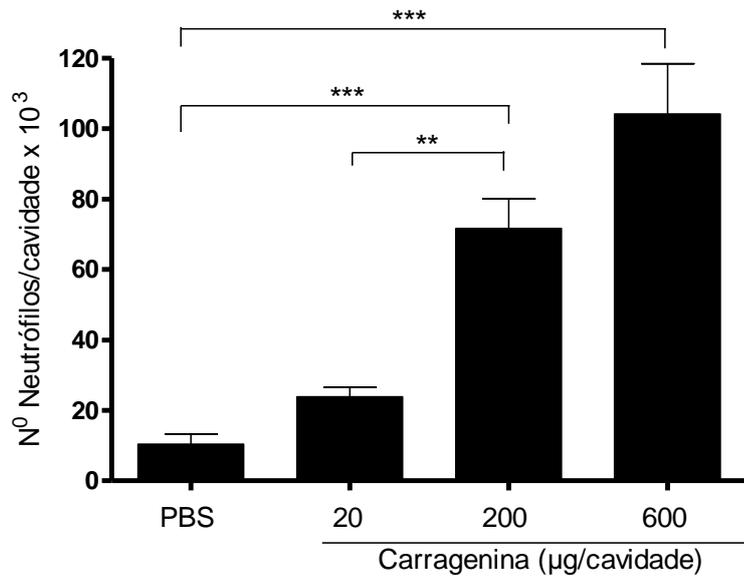
## 5 RESULTADOS

Os efeitos induzidos pela nicotinamida e pelo ácido nicotínico serão apresentados separadamente, a fim de facilitar o entendimento dos mesmos. Primeiro, serão apresentados os resultados referentes à ação da nicotinamida e em seguida os resultados relacionados à ação do ácido nicotínico, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes estímulos.

Em todos os experimentos, o número de eosinófilos presentes na cavidade pleural dos camundongos desafiados com os agentes flogogênicos e tratados ou não com ácido nicotínico ou nicotinamida, não foi diferente da quantidade dessas células presentes na cavidade pleural dos animais que receberam apenas injeção com PBS. Assim, esses resultados não serão apresentados.

### **Determinação da dose de carragenina a ser utilizada nos experimentos de pleurisia**

Inicialmente, foram realizados experimentos com o objetivo de determinar a dose de carragenina eficaz em induzir o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais. As administrações de carragenina nas doses de 200 e 600 µg/cavidade aumentaram de maneira dose dependente o número total de leucócitos e de neutrófilos na cavidade pleural dos camundongos, mais não de células mononucleares (**Figura 4**) e (**Tabela 1**). Com base neste resultado, a dose de 200 µg/cavidade foi utilizada nos experimentos de pleurisia induzida por carragenina.



**Figura 4. Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes doses de carragenina.** Os animais receberam injeções de carragenina em diferentes doses (20, 200 ou 600 µg/cavidade) pela via i.pl.. O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após a injeção de carragenina. \*\* e \*\*\* representam respectivamente  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ . n = 6.

**Tabela 1. Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 h após administração i.pl. de diferentes doses de carragenina.**

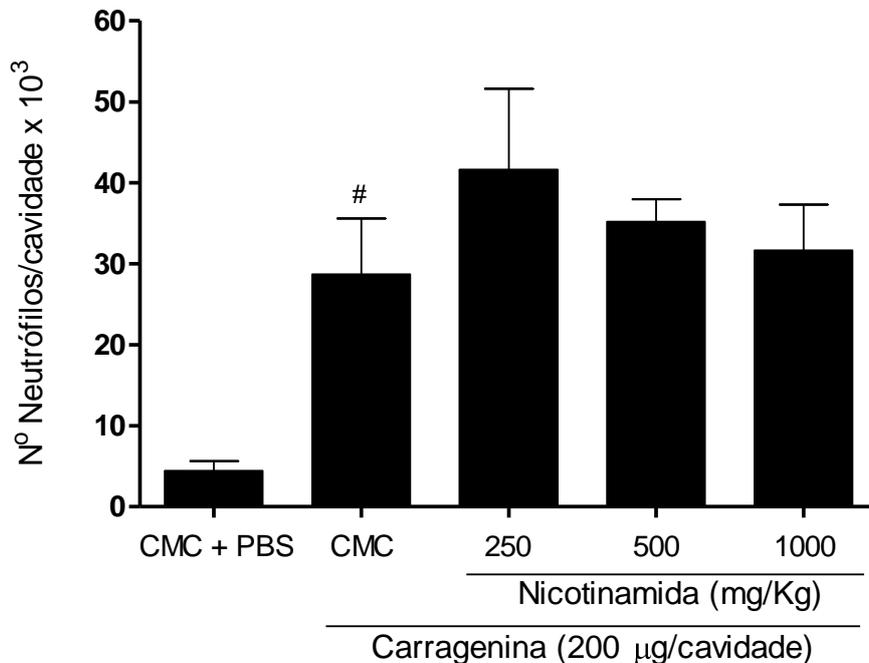
	PBS	Carragenina (µg/cavity)		
		20	200	600
Total	25,1 ± 2,6	37,9 ± 3,4	90,4 ± 9,7 <sup>***</sup>	116,9 ± 6,9 <sup>***</sup>
Neutrófilos	10,4 ± 2,9	23,8 ± 2,7	71,7 ± 8,4 <sup>***</sup>	104,1 ± 14,3 <sup>***</sup>
Macrófagos	14,6 ± 1,5	14,1 ± 1,0	18,7 ± 1,8	12,7 ± 3,4

Os valores representam a média e o erro padrão da média x10<sup>3</sup> células. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (PBS). n = 6.

## 5.1 Nicotinamida

### Efeito induzido pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção de carragenina na cavidade pleural

Camundongos foram pré-tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) *per os* 1 h antes da injeção i.pl. de carragenina (200 µg/cavidade). O pré-tratamento dos animais com nicotinamida não inibiu o recrutamento de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais que foram desafiados com carragenina (**Figura 5**). O número de leucócitos e de células mononucleares também não foi reduzido pelo pré-tratamento com nicotinamida (**Tabela 2**).



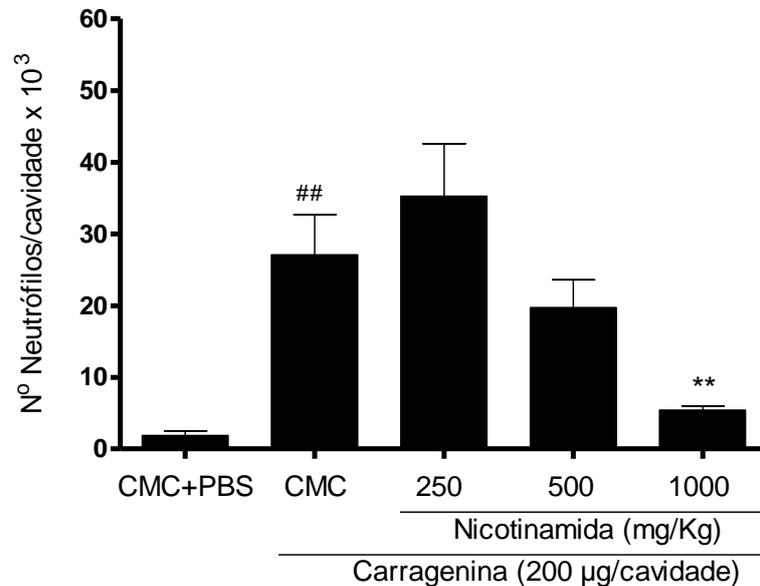
**Figura 5. Efeito induzido pelo pré-tratamento com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) 1 h antes da injeção i.pl. de carragenina (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio. # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS).  $n=5$ .

**Tabela 2.** Efeito induzido pelo pré-tratamento com nicotinamida sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

	CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade			
		CMC	Nicotinamida (mg/Kg)		
			250	500	1000
Total	9,7 ± 1,8	36,7 ± 9,3	55,6 ± 12,9	47,44 ± 4,0	41,1 ± 6,7
Neutrófilos	4,4 ± 1,1	28,7 ± 6,9 #	41,6 ± 9,9	35,2 ± 2,8	31,7 ± 5,6
Macrófagos	5,2 ± 1,1	8,0 ± 2,4	14,0 ± 3,2	12,1 ± 1,7	9,3 ± 1,3

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). n=5.

Uma vez que o pré-tratamento com nicotinamida não inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos camundongos, o protocolo para administração da nicotinamida foi modificado, passando a constar de duas administrações da droga. Dessa forma, foi realizado um tratamento com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) 30 min antes da injeção i.pl. da carragenina (200 µg/cavidade) e um segundo tratamento, 1 h após essa injeção. Apenas nos animais que receberam o duplo tratamento com a maior dose de nicotinamida (1000 mg/Kg) foi observada redução no número de neutrófilos presentes na cavidade pleural, 4 h após o desafio com carragenina (**Figura 6**). O número total de leucócitos não foi reduzido e o número de células mononucleares não foi alterado (**Tabela 3**).



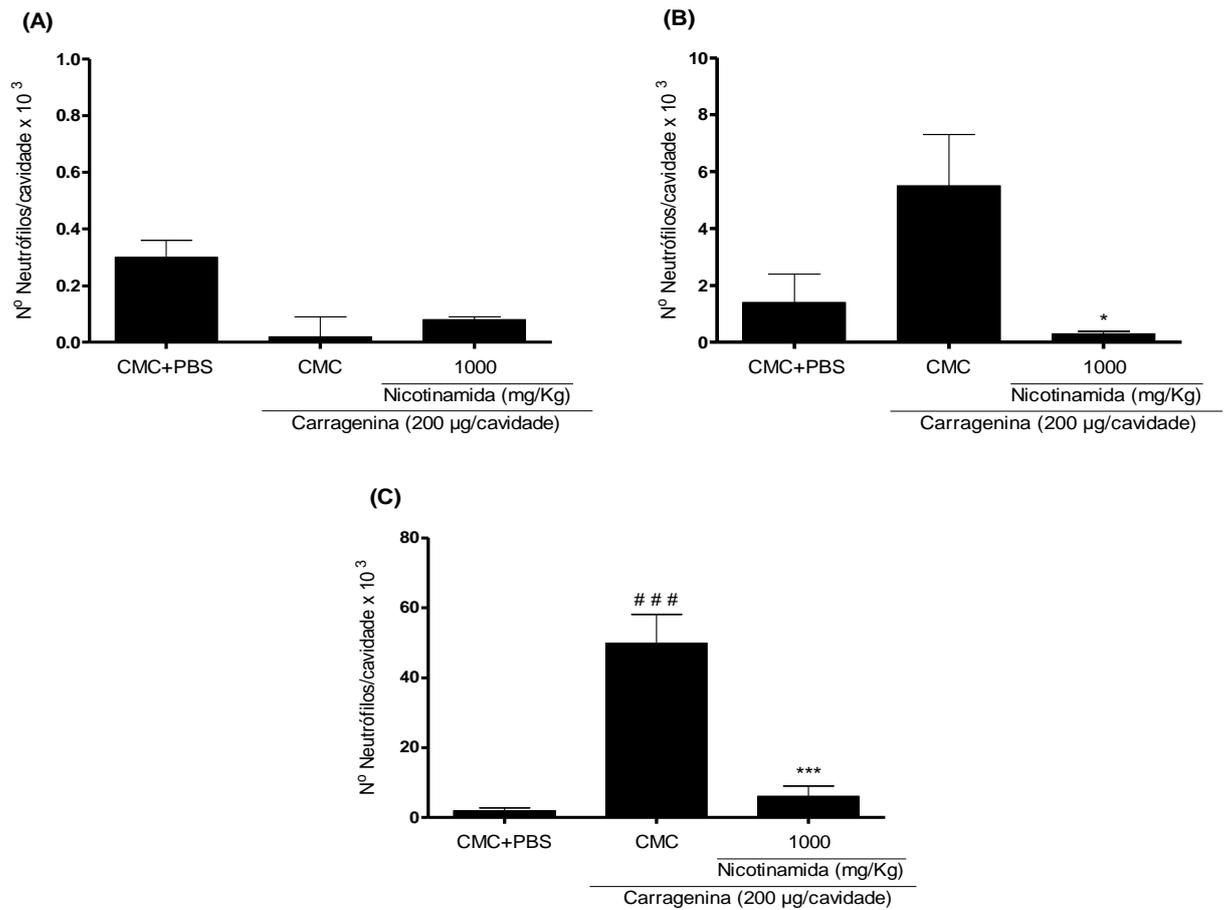
**Figura 6.** Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de carragenina. Os camundongos foram tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio com carragenina. \*\* representa  $p < 0,01$  em relação a (CMC+CG) e ## representa  $p < 0,01$  em relação a (CMC+PBS).  $n=5$ .

**Tabela 3.** Efeito induzido pelo pré- e pós-tratamentos com nicotinamida sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

	CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade			
		CMC	Nicotinamida (mg/Kg)		
			250	500	1000
Total	7,7 ± 2,0	33,7 ± 6,0 #	45,4 ± 9,3	26,0 ± 4,4	11,1 ± 0,5
Neutrófilos	1,9 ± 0,6	27,1 ± 5,6 ##	35,3 ± 7,3	19,7 ± 3,9	5,4 ± 0,6**
Macrófagos	5,7 ± 1,5	6,5 ± 0,8	10,0 ± 2,1	6,3 ± 0,6	5,6 ± 0,9

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. # e ## representam respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  em relação a (CMC + PBS); \*\* representa  $p < 0,01$  em relação a (CMC+CG).  $n=5$ .

Após a verificação da eficácia da nicotinamida em inibir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos, foram realizados testes para avaliar a cinética de migração de leucócitos para a cavidade pleural de animais desafiados com carragenina (200 µg/cavidade) e tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg). Os animais foram tratados com essa vitamina 30 min antes da injeção com carragenina e um segundo tratamento foi realizado 1 h após. Os camundongos foram eutanasiados 30 min, 2 h e 4 h após a injeção com carragenina, sendo que os animais do primeiro grupo, eutanasiados 30 min após a administração de carragenina, receberam apenas o primeiro tratamento com nicotinamida. Nos animais tratados com nicotinamida, o número de neutrófilos presentes na cavidade pleural foi reduzido na segunda e quarta horas após a injeção de carragenina (**Figura 7**). O número total de leucócitos foi reduzido apenas na quarta hora após a injeção de carragenina e o número de células mononucleares não sofreu variação em nenhum dos momentos avaliados (**Tabela 4**).



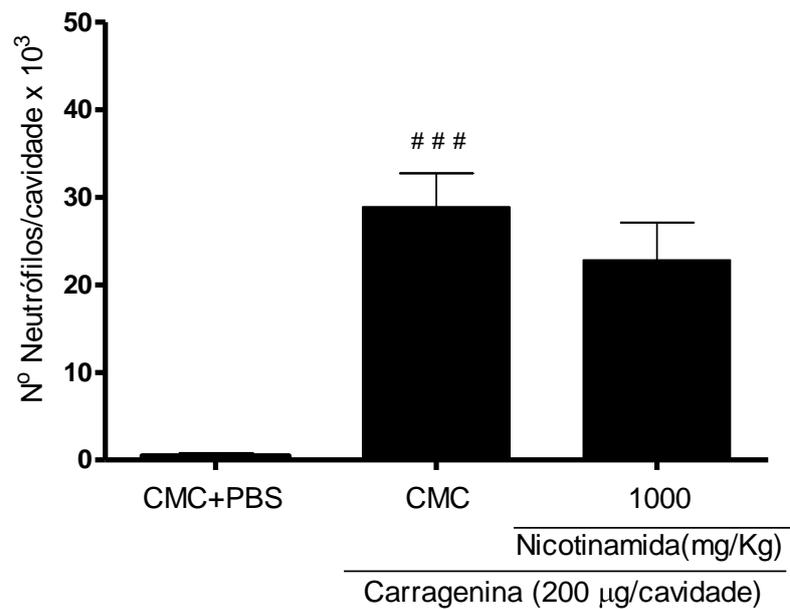
**Figura 7. Efeito induzido pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina, em diferentes momentos.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (200 µg/cavidade). As figuras (A), (B) e (C) indicam o número de neutrófilos encontrados na cavidade pleural dos animais eutanasiados 0,5 - 2 e 4 h, respectivamente, após a injeção de carragenina. Os animais eutanasiados 0,5 h após a injeção de carragenina receberam apenas o primeiro tratamento com nicotinamida. \* e \*\*\* representam respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+CG); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). n=6.

**Tabela 4.** Ação inibitória da nicotinamida sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

		CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade	
			CMC	NIC (1000 mg/Kg)
0,5 h	Total	6,6 ± 0,5	6,1 ± 1,5	6,8 ± 0,7
	Neutrófilos	0,3 ± 0,06	0,2 ± 0,07	0,08 ± 0,01
	Macrófagos	6,2 ± 0,5	5,8 ± 1,4	6,7 ± 0,7
<hr/>				
2 h	Total	7,6 ± 1,5	15,2 ± 2,5	10,33 ± 1,1
	Neutrófilos	1,4 ± 1,0	5,5 ± 1,8	0,3 ± 0,08*
	Macrófagos	6,0 ± 0,5	9,6 ± 1,1	10,0 ± 1,0
<hr/>				
4 h	Total	6,8 ± 1,7	61,0 ± 11,8 ###	10,8 ± 2,3****
	Neutrófilos	2,0 ± 0,8	49,9 ± 8,2 ###	6,1 ± 2,9****
	Macrófagos	4,7 ± 0,9	11,17 ± 3,7	4,7 ± 1,3

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \* e \*\*\*\* representam respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+CG); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). n=6.

Para avaliar o efeito do pós-tratamento com nicotinamida (1000 mg/Kg) sobre a migração de leucócitos, os camundongos foram tratados 2 h após a injeção com carragenina (200 µg/cavidade) (**Figura 8**). Os animais que receberam apenas pós-tratamento com nicotinamida não apresentaram redução do número de neutrófilos presentes na cavidade pleural induzida pela injeção com carragenina. O número total de leucócitos também não apresentou redução após tratamento único com nicotinamida, já o número de células mononucleares não apresentou variação (**Tabela 5**).



**Figura 8.** Efeito induzido pelo pós-tratamento com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina. Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 2 h após administração de carragenina na cavidade pleural (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após a administração de carragenina. ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6; CMC+CG n = 7; CG+NIC 1000 mg/Kg n = 6).

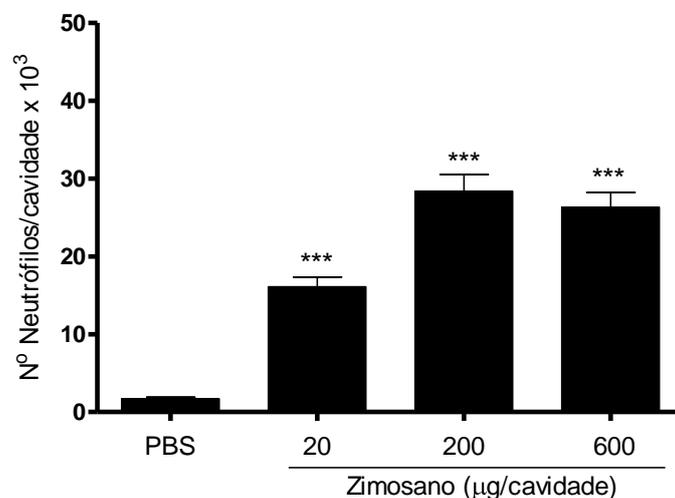
**Tabela 5.** Efeito induzido pelo pós-tratamento com nicotinamida sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

	CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade	
		CMC	NIC (1000 mg/Kg)
Total	7,8 ± 1,3	38,2 ± 4,8 ###	30,6 ± 5,0
Neutrófilos	0,4 ± 0,2	28,9 ± 3,8 ###	22,8 ± 4,0
Macrófagos	7,3 ± 1,3	9,3 ± 1,9	9,6 ± 1,6

Os valores representam a média e o erro padrão da média x10<sup>3</sup> células. ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6, CMC+CG n = 7, CG+NIC 1000 mg/Kg n = 6).

### Efeito induzido pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção de zimosano na cavidade pleural

Para determinar a dose de zimosano eficaz em induzir migração de leucócitos para a cavidade pleural de camundongos, foram realizados experimentos em que 20, 200 ou 600  $\mu\text{g}/0,1\text{ mL}$  de zimosano foram injetados na cavidade pleural, sendo que, 4 h após o desafio, os animais foram eutanasiados e a contagem de leucócitos realizada. Todas as doses utilizadas foram eficazes em induzir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos camundongos (**Figura 9**). O número total de leucócitos encontrados na cavidade pleural também aumentou, enquanto que o número de mononucleares sofreu alterações apenas com a dose de 20  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$  (**Tabela 6**). A dose de zimosano de 200  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$  foi escolhida para a realização dos protocolos posteriores por se tratar de uma dose intermediária, capaz de induzir resposta máxima.



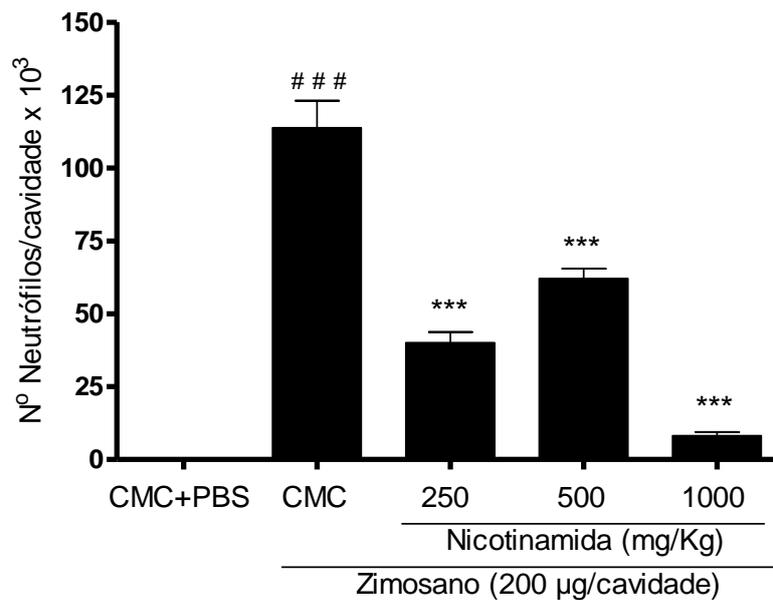
**Figura 9. Migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por diferentes doses de zimosano.** Os animais receberam injeções com zimosano (20, 200 ou 600  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após a injeção de zimosano.\*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (PBS).  $n=6$ .

**Tabela 6.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos 4 h após administração i.pl. de diferentes doses de zimosano.

	PBS	Zimosano ( $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ )		
		20	200	600
Total	$8,6 \pm 1,2$	$25,9 \pm 2,8$ ***	$33,8 \pm 6,0$ **	$33,1 \pm 5,5$ **
Neutrófilos	$1,7 \pm 0,5$	$16,1 \pm 3,1$ ***	$28,4 \pm 5,2$ ***	$26,3 \pm 4,7$ ***
Macrófagos	$6,8 \pm 1,0$	$9,7 \pm 1,7$ **	$5,4 \pm 0,9$	$6,7 \pm 1,1$

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \*\* e \*\*\* representam respectivamente  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (PBS).  $n=6$ .

Para avaliar se o tratamento com nicotinamida inibe a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por zimosano (200  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ), os animais foram tratados com a vitamina nas doses de 250, 500 ou 1000mg/Kg, 30 min antes e 1 h após o desafio com zimosano. O tratamento com nicotinamida reduziu a migração de neutrófilos em todas as doses testadas (**Figura 10**). O número total de leucócitos e o número de células mononucleares encontrados na cavidade pleural dos camundongos também foram reduzidos nos animais tratados com as três doses de nicotinamida (**Tabela 7**).



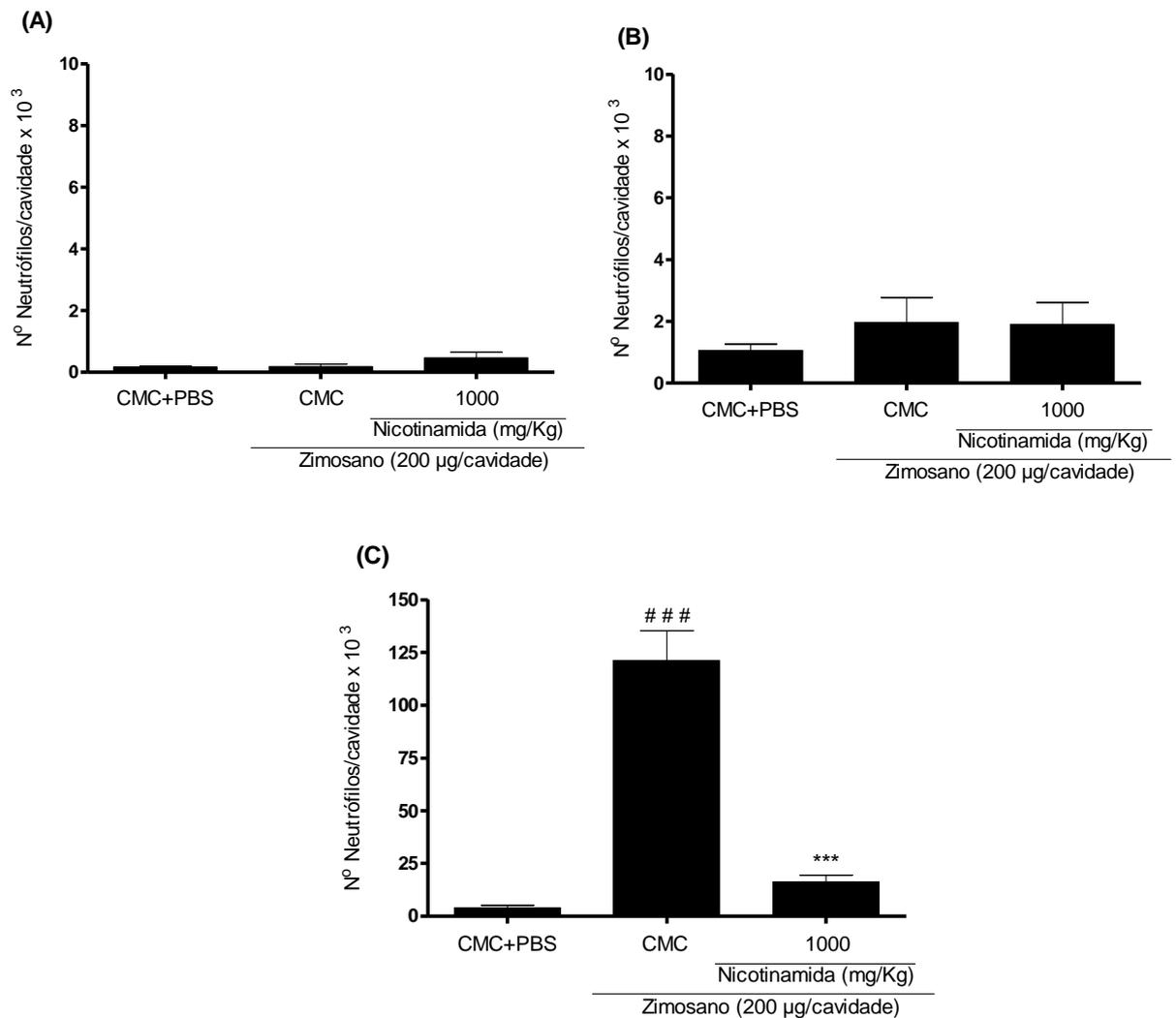
**Figura 10. Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (250, 500 ou 1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com zimosano (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+ZYM); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS).  $n=5$ .

**Tabela 7. Efeito induzido pelo pré e pós-tratamento com nicotinamida sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de zimosano.**

	CMC + PBS	Zimosano 200 µg/cavidade			
		CMC	Nicotinamida (mg/Kg)		
			250	500	1000
Total	4,1 ± 0,5	135,3 ± 29,2 <sup>###</sup>	45,5 ± 9,8 <sup>*</sup>	68,7 ± 9,7 <sup>**</sup>	16,0 ± 5,3 <sup>***</sup>
Neutrófilos	0,04 ± 0,01	113,7 ± 22,9 <sup>###</sup>	40,1 ± 8,9 <sup>***</sup>	62,1 ± 8,0 <sup>***</sup>	8,1 ± 2,7 <sup>***</sup>
Macrófagos	4,1 ± 0,5	21,5 ± 6,9 <sup>###</sup>	5,4 ± 1,0 <sup>***</sup>	6,6 ± 1,8 <sup>***</sup>	9,2 ± 3,6 <sup>***</sup>

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \*, \*\* e \*\*\* representam respectivamente  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+ZYM); # ## representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS).  $n=5$ .

Após a constatação da eficácia da nicotinamida em inibir a migração de neutrófilos induzida pelo zimosano, foram realizados testes para avaliar o perfil cinético de migração de leucócitos para a cavidade pleural de camundongos desafiados com zimosano (200 µg/cavidade) e tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg). Os animais foram tratados 30 min antes e 1 h após o desafio. Os animais foram divididos em grupos e eutanasiados 30 min, 2 h e 4 h após a injeção de zimosano. Dessa forma os animais do primeiro grupo, eutanasiados 30 min após a administração de zimosano, receberam apenas o primeiro tratamento com nicotinamida. Nos animais tratados com nicotinamida, o número de neutrófilos presentes na cavidade pleural foi reduzido apenas na quarta hora após a injeção com zimosano (**Figura 11**). O número total de leucócitos também foi reduzido apenas na quarta hora após o desafio com zimosano e o número de células mononucleares presentes na cavidade pleural dos animais eutanasiados em todos os momentos não sofreu variação (**Tabela 8**).



**Figura 11. Efeito induzido pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano, em diferentes momentos.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 0,5h antes e 1 h após desafio com zimosano (200 µg/cavidade). As figuras (A), (B) e (C) indicam o número de neutrófilos encontrados na cavidade pleural dos animais eutanasiados 0,5 - 2 e 4 h, respectivamente, após a injeção de zimosano. Os animais eutanasiados 0,5 h após a injeção de zimosano receberam apenas o primeiro tratamento com nicotinamida. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+ZYM); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). Número de animais por grupo no intervalo de: **0,5 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=9, NIC+ZYM n=8); **2 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=8; NIC+ZYM n=8) e **4 h** (CMC+PBS n= 8, CMC+ZYM n=6, NIC+ZYM n=8).

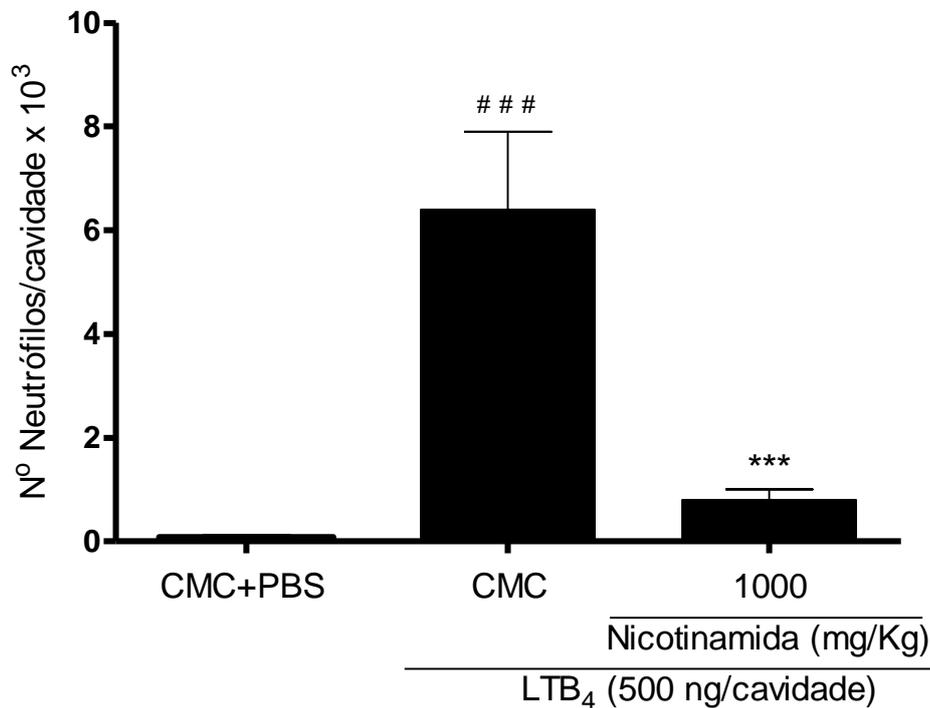
**Tabela 8.** Efeito induzido pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano.

		CMC + PBS	Zimosano 200 µg/cavidade	
			CMC	NIC (1000 mg/Kg)
0,5 h	Total	11,9 ± 2,2	8,5 ± 1,1	12,9 ± 2,8
	Neutrófilos	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,05
	Macrófagos	11,7 ± 2,1	8,4 ± 1,0	12,7 ± 2,7
2 h	Total	11,6 ± 1,5	13,9 ± 2,4	12,4 ± 1,8
	Neutrófilos	1,0 ± 0,2	1,9 ± 0,8	1,9 ± 0,7
	Macrófagos	10,6 ± 1,5	12,0 ± 1,8	10,5 ± 1,7
4 h	Total	13,0 ± 3,1	134,7 ± 15,1 <sup>###</sup>	26,3 ± 4,5 <sup>***</sup>
	Neutrófilos	4,0 ± 1,1	121,1 ± 14,1 <sup>###</sup>	16,3 ± 3,1 <sup>***</sup>
	Macrófagos	9,0 ± 2,0	13,5 ± 2,2	10,0 ± 2,3

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+ZYM); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). Número de animais por grupo no intervalo de: **0,5 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=9, NIC+ZYM n=8); **2 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=8; NIC+ZYM n=8) e **4 h** (CMC+PBS n= 8, CMC+ZYM n=6, NIC+ZYM n=8).

### **Efeito induzido pela nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção de LTB<sub>4</sub> ou IL-8 na cavidade pleural**

Uma vez que a nicotinamida foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida por agentes flogogênicos que evocam a liberação de diferentes mediadores inflamatórios, foram utilizados dois agentes quimiotáticos seletivos para neutrófilos, a saber, LTB<sub>4</sub> e IL-8. No primeiro protocolo, os animais foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg), 30 min antes e 1 h após injeção de LTB<sub>4</sub> (500 ng/cavidade). O número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural dos camundongos foi avaliado 4 h após o desafio com o agente flogogênico. O duplo tratamento com nicotinamida foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais induzida pelo LTB<sub>4</sub> (**Figura 12**). O número total de leucócitos também sofreu redução, já o número de células mononucleares não foi alterado pela injeção do agente quimiotático (**Tabela 9**).



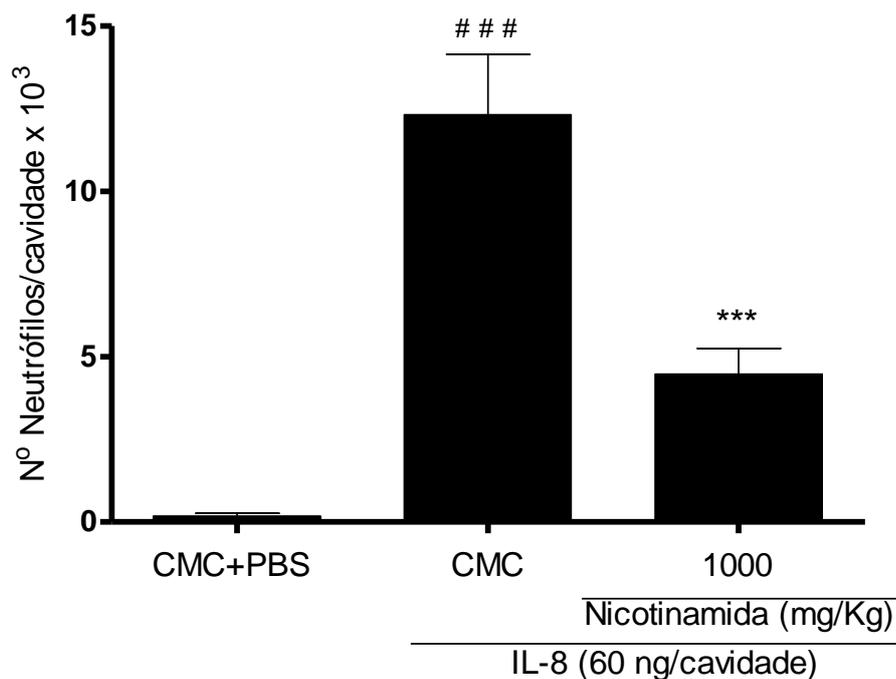
**Figura 12.** Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de LTB<sub>4</sub>. Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com LTB<sub>4</sub> (500 ng/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio com LTB<sub>4</sub>. \*\*\* representa p<0,001 em relação a (CMC+LTB<sub>4</sub>); ### representa p<0,001 em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 10; CMC+ LTB<sub>4</sub> n = 10; LTB<sub>4</sub>+NIC 1000 mg/Kg n=8).

**Tabela 9.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com nicotinamida 4 h após administração i.pl de LTB<sub>4</sub>.

	CMC + PBS	LTB <sub>4</sub> 500 ng/cavidade	
		CMC	NIC (1000 mg/Kg)
Total	4,7 ± 0,7	12,3 ± 1,5 ###	7,6 ± 0,8 ***
Neutrófilos	0,8 ± 0,2	6,4 ± 1,5 ###	0,8 ± 0,2 ***
Macrófagos	4,6 ± 0,7	5,9 ± 1,1	6,7 ± 0,9

Os valores representam a média e o erro padrão da média x10<sup>3</sup> células. \*\*\* representa p<0,001 em relação a (CMC+LTB<sub>4</sub>); # # # representa p<0,001 em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 10; CMC+ LTB<sub>4</sub> n = 10; LTB<sub>4</sub>+NIC 1000 mg/Kg n=8).

Com o objetivo de avaliar se nicotinamida era capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida por IL-8 (60 ng/cavidade), os animais foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 30 min antes do desafio com a citocina, sendo que um segundo tratamento foi realizado 1 h após o desafio. O número de leucócitos presentes na cavidade pleural dos camundongos foi avaliado 4 h após a injeção de IL-8. Assim como foi observado com os animais desafiados com LTB<sub>4</sub>, o duplo tratamento com nicotinamida inibiu a migração de neutrófilos induzida pela IL-8 (**Figura 13**). O número total de leucócitos não foi reduzido e o número de células mononucleares não sofreu variações significativas após a injeção de IL-8 (**Tabela 10**).



**Figura 13. Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de IL-8.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com IL-8 (60 ng/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio com IL-8. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+IL-8); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6; CMC+ IL-8 n= 7; IL-8+NIC 1000 mg/Kg n= 7).

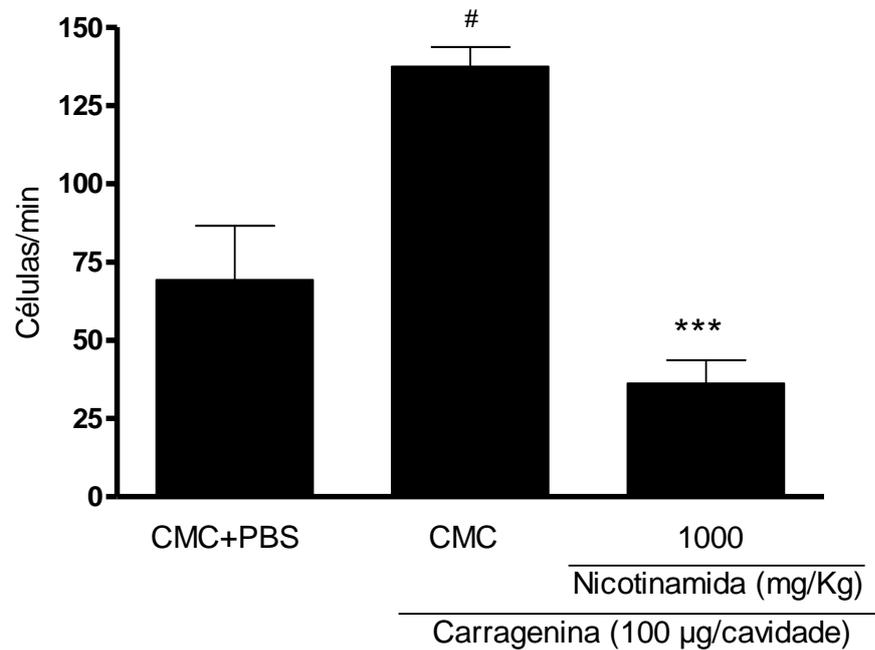
**Tabela 10.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com nicotinamida 4 h após administração i.pl. de interleucina-8.

	CMC + PBS	IL-8 60 ng/cavidade	
		CMC	NIC (1000 mg/Kg)
Total	7,4 ± 1,8	18,1 ± 2,3 ##	12,9 ± 1,8
Neutrófilos	0,1 ± 0,09	12,3 ± 1,5 ###	4,4 ± 0,7***
Macrófagos	7,2 ± 1,7	5,8 ± 0,6	8,4 ± 1,3

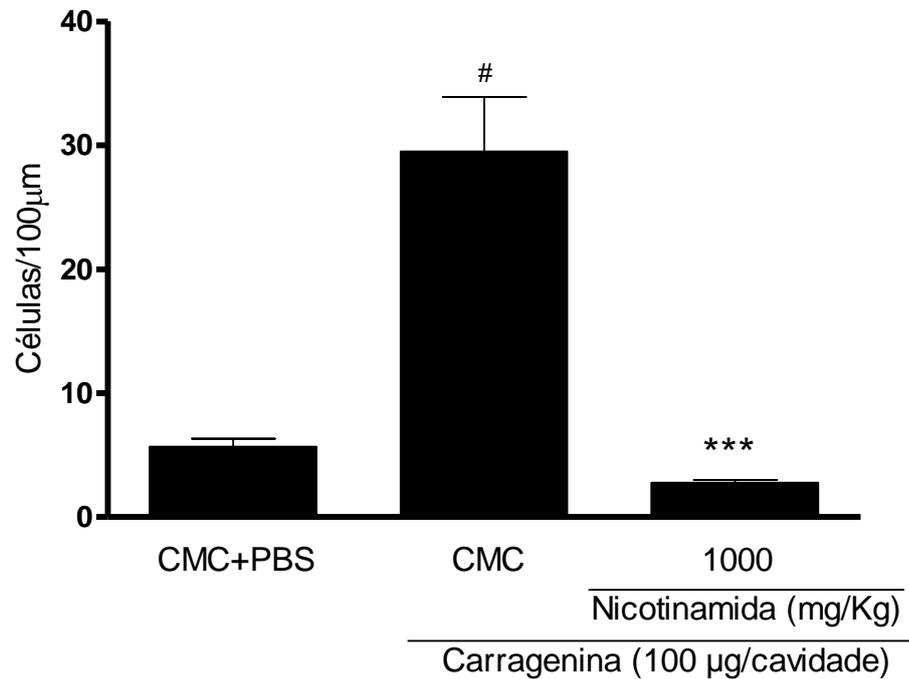
Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. ## e ### representam respectivamente  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS); \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+IL-8). (CMC+PBS n = 6; CMC+ IL-8 n= 7; IL-8+NIC 1000 mg/Kg n= 7).

#### **Efeito induzido pela nicotinamida sobre o rolamento e a adesão de neutrófilos na microcirculação do músculo cremaster induzidos por carragenina**

Com o objetivo de estudar como o tratamento com nicotinamida poderia interferir nos processos microvasculares relacionados à migração de leucócitos, foram realizados testes utilizando a técnica de microscopia intravital. Especificamente, a técnica foi aplicada para visualizar os processos de rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster de camundongos. Para isto, os animais receberam injeções de carragenina (100  $\mu$ g) diretamente na bolsa escrotal, sendo administrada nicotinamida (1000 mg/Kg, p.o.) 30 min antes e 1h após o desafio. O tratamento com a vitamina inibiu tanto o rolamento (**Figura 14**), quanto a adesão (**Figura 15**) de leucócitos ao endotélio da microcirculação do músculo cremaster.



**Figura 14. Efeito induzido pela nicotinamida sobre o rolamento de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzida pela administração local de carragenina.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (100 µg/cavidade-i.sc.). As imagens foram coletadas 4 h após a injeção de carragenina. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+CG); # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 3; CMC+CG n = 4; CG+NIC 1000 mg/Kg n = 4).

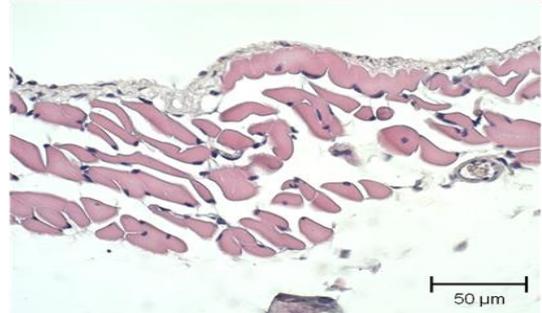
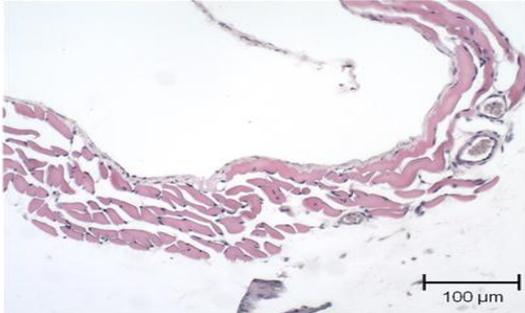


**Figura 15. Efeito induzido pela nicotinamida sobre a adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzida pela administração local de carragenina.** Os camundongos foram tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (100 µg/cavidade-i.sc.). As imagens foram coletadas 4 h após a injeção de carragenina. \*\*\* representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+CG); # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS  $n = 3$ ; CMC+CG  $n = 4$ ; CG+NIC 1000 mg/Kg  $n = 4$ ).

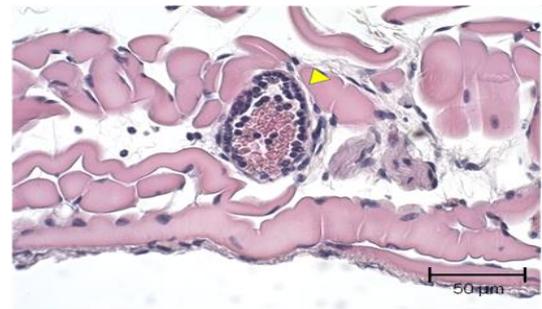
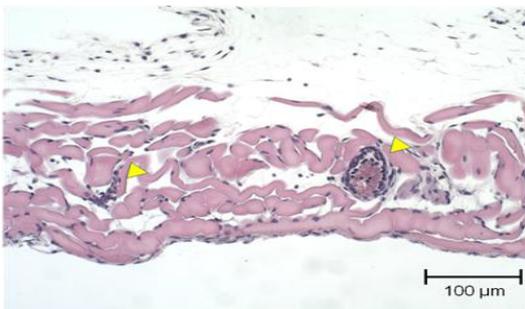
Para confirmar os resultados encontrados após a microscopia intravital, o músculo cremaster dos animais foi retirado e utilizado para a confecção de lâminas histológicas. A análise qualitativa das lâminas revelou uma redução do número de leucócitos presentes na região intersticial do músculo cremaster dos camundongos desafiados com carragenina e tratados com nicotinamida (**Figura 16**).

## Cortes histológicos do músculo cremaster de camundongos tratados com nicotinamida

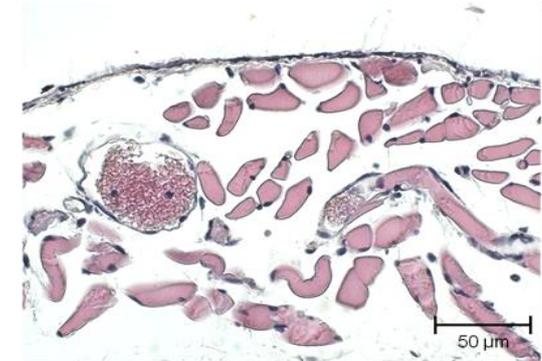
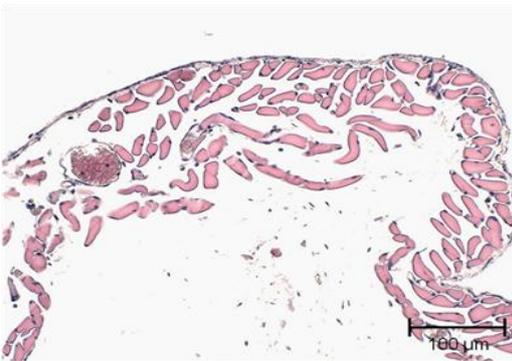
### (A) CMC+PBS



### (B) CMC+CG



### (C) NIC+CG



Aumento 100x

Aumento 200x

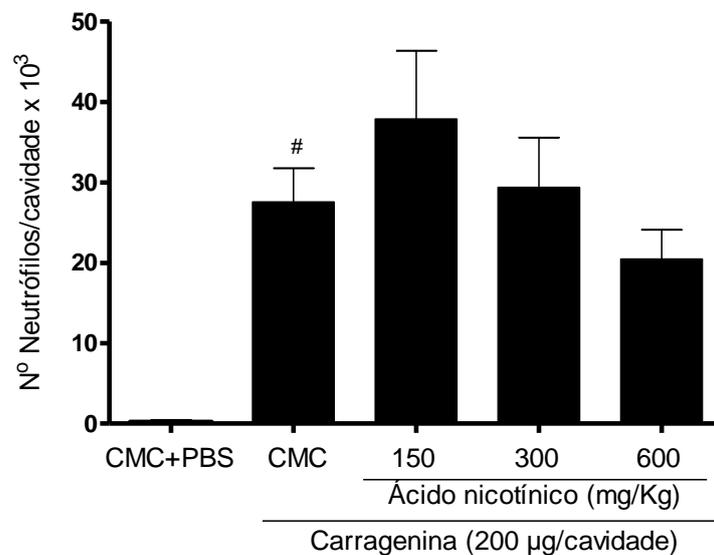
**Figura 16. Avaliação da presença de leucócitos na região intersticial do músculo cremaster induzida pela injeção local de carragenina em camundongos tratados com nicotinamida.** Animais tratados com veículo (CMC); p.o. + injeção de salina (i.sc.) **(A)**. Animais tratados com veículo (CMC); p.o. + injeção de carragenina (100 μg/cavidade-i.sc.) **(B)**. Animais tratados com nicotinamida (1000 mg/Kg); p.o., 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (100 μg/cavidade-i.sc.) **(C)**. Coloração: (HE).

## 5.2 Ácido Nicotínico

### Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção de carragenina na cavidade pleural de camundongos

Assim como nos protocolos envolvendo a nicotinamida, a dose de 200 µg/cavidade de carragenina (**Figura 4**) foi utilizada em todos os procedimentos envolvendo a administração de ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg).

Os animais foram tratados 1 h antes do desafio com carragenina. Porém, o tratamento único não foi suficiente para reduzir a migração de neutrófilos induzida pela carragenina (**Figura 17**). A migração de leucócitos totais e de células mononucleares induzida pela injeção de carragenina não foi alterada pela injeção de carragenina (**Tabela 11**).



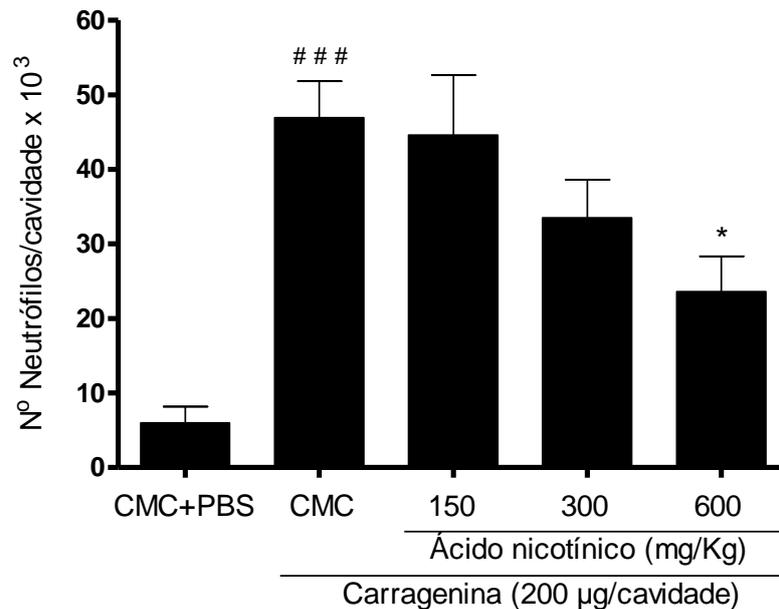
**Figura 17. Efeito induzido pelo pré-tratamento com ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg) 1 h antes da injeção i.pl. de carragenina (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio. # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 4; CMC+CG n = 5; CG+NIA 150, 300, 600 mg/Kg n = 5).

**Tabela 11.** Efeito induzido pelo pré-tratamento com ácido nicotínico sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

	CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade			
		CMC	Ácido nicotínico (mg/Kg)		
			150	300	600
Total	3,3 ± 0,7	34,2 ± 5,3	48,4 ± 11,24	37,0 ± 7,0	26,7 ± 4,4
Neutrófilos	0,2 ± 0,1	27,6 ± 4,2 #	37,9 ± 8,5	29,4 ± 6,2	37,9 ± 8,5
Macrófagos	3,0 ± 0,6	6,6 ± 1,0	10,5 ± 2,7	7,5 ± 1,1	6,1 ± 1,0

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 4; CMC+CG n = 5; CG+NIA 150, 300, 600 mg/Kg n = 5).

Um segundo protocolo experimental foi realizado e os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg) 30 min antes e 1 h após injeção com carragenina (200 µg/cavidade). Apenas nos animais tratados com a maior dose do ácido nicotínico, foi observada redução do número de neutrófilos 4 h após injeção de carragenina (**Figura 18**). O número total de leucócitos e o número de células mononucleares não sofreram redução (**Tabela 12**).



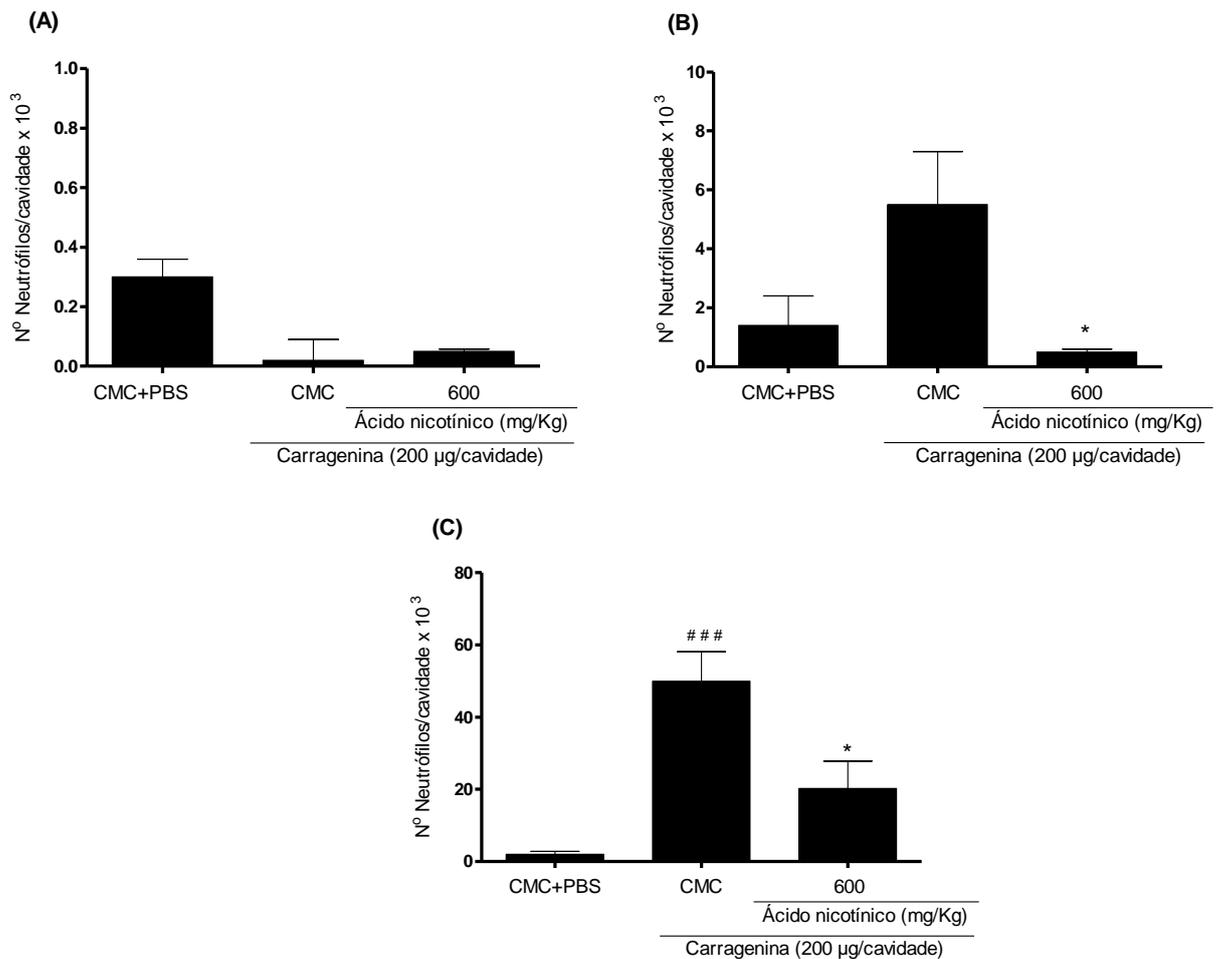
**Figura 18.** Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração intrapleural de carragenina. Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio com carragenina. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+CG); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS).  $n=5$ .

**Tabela 12.** Efeito induzido pelo pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

	CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade			
		CMC	Ácido nicotínico (mg/Kg)		
			150	300	600
Total	12,2 ± 2,0	62,9 ± 7,8	50,6 ± 15,2	49,7 ± 8,1	29,3 ± 5,2
Neutrófilos	6,0 ± 2,2	46,9 ± 4,9 <sup>###</sup>	44,6 ± 8,0	35,5 ± 5,1	23,69 ± 4,7 <sup>*</sup>
Macrófagos	6,2 ± 1,0	16,0 ± 3,0	14,3 ± 2,7	14,2 ± 4,0	5,6 ± 1,0

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+CG); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS).  $n=5$ .

Assim como a nicotinamida, o ácido nicotínico inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por carragenina. Para avaliar a cinética dessa migração, os animais foram desafiados com carragenina (200 µg/cavidade) e tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 30 min antes e 1 h após o desafio com carragenina. Os animais foram divididos em grupos e eutanasiados 30 min, 2 h e 4 h após a injeção de carragenina. Desta forma, os camundongos eutanasiados 30 min após a administração de carragenina, receberam apenas o primeiro tratamento com o ácido nicotínico. Nos animais tratados com essa vitamina, o número de neutrófilos na cavidade pleural foi reduzido na segunda e quarta horas após a injeção com carragenina (**Figura 19**). O número total de leucócitos foi reduzido apenas na quarta hora após o desafio. O número de células mononucleares não foi alterado após a injeção de carragenina em nenhum dos momentos avaliados (**Tabela 13**).



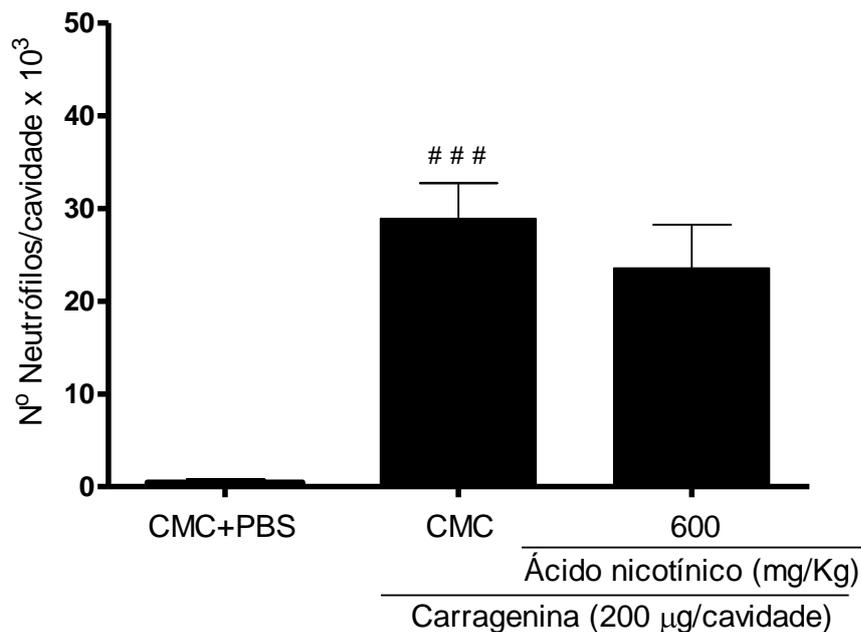
**Figura 19. Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.p.l. de carragenina, em diferentes momentos.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (200 µg/cavidade). As figuras (A), (B) e (C) indicam o número de neutrófilos encontrados na cavidade pleural dos animais eutanasiados 0,5 - 2 e 4 h, respectivamente, após a injeção de carragenina. Os animais eutanasiados 0,5 h após a injeção de carragenina receberam apenas o primeiro tratamento com ácido nicotínico. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+CG); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). Número de animais por grupo no intervalo de: **0,5 h** (CMC+PBS n=6, CMC+CG n=6, NIA+CG n=6); **2 h** (CMC+PBS n=6, CMC+CG n=6; NIA+CG n=6) e **4 h** (CMC+PBS n= 6, CMC+CG n=6, NIA+CG n=5).

**Tabela 13.** Ação inibitória do ácido nicotínico sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

		CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade	
			CMC	NIA (600 mg/Kg)
0,5 h	Total	6,6 ± 0,5	6,1 ± 1,5	5,2 ± 0,7
	Neutrófilos	0,3 ± 0,06	0,2 ± 0,07	0,05 ± 0,008
	Macrófagos	6,2 ± 0,5	5,8 ± 1,4	5,2 ± 0,7
<hr/>				
2 h	Total	7,6 ± 1,5	15,2 ± 2,5	6,5 ± 1,1
	Neutrófilos	1,4 ± 1,0	5,5 ± 1,8	0,5 ± 0,1*
	Macrófagos	6,0 ± 0,5	9,6 ± 1,1	5,9 ± 1,0
<hr/>				
4 h	Total	6,8 ± 1,7	61,0 ± 11,8 <sup>###</sup>	33,4 ± 6,9
	Neutrófilos	2,0 ± 0,8	49,9 ± 8,2 <sup>###</sup>	20,2 ± 7,6 <sup>**</sup>
	Macrófagos	4,7 ± 0,9	11,17 ± 3,7	13,2 ± 3,3

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \* e \*\* representam respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  em relação a (CMC+CG); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). Número de animais por grupo no intervalo de: **0,5 h** (CMC+PBS n=6, CMC+CG n=6, NIA+CG n=6); **2 h** (CMC+PBS n=6, CMC+CG n=6; NIA+CG n=6) e **4 h** (CMC+PBS n= 6, CMC+CG n=6, NIA+CG n=5).

Para avaliar se o pós-tratamento com ácido nicotínico (600 mg/Kg) era capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos desafiados com carragenina (200 µg/cavidade), os animais foram tratados com ácido nicotínico 2 h após a administração do agente flogogênico. Assim como ocorreu com os animais que receberam pós-tratamento com nicotinamida, o tratamento único com ácido nicotínico não provocou redução no número de neutrófilos 4 h após o desafio com carragenina (**Figura 20**). O número total de leucócitos presentes na cavidade pleural não foi reduzido pelo pós-tratamento com ácido nicotínico. Já o número de células mononucleares não apresentou variação em relação aos valores iniciais (**Tabela 14**).



**Figura 20.** Efeito induzido pelo pós-tratamento com ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de carragenina. Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 2 h após administração de carragenina na cavidade pleural (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após a administração de carragenina. ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6; CMC+CG n = 7; CG+NIA 600 mg/Kg n = 7).

**Tabela 14.** Efeito induzido pelo pós-tratamento com ácido nicotínico sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de carragenina.

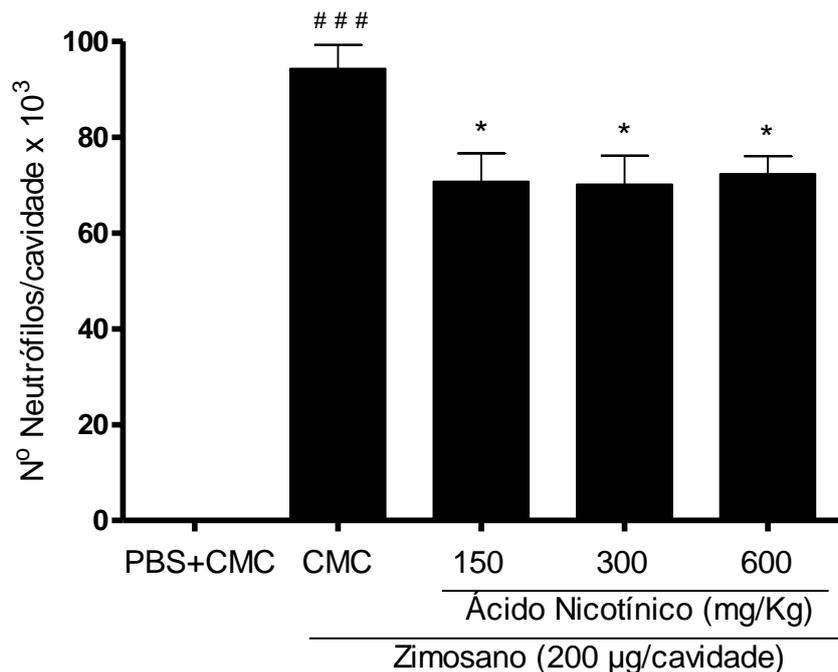
	CMC + PBS	Carragenina 200 µg/cavidade	
		CMC	NIA (600 mg/Kg)
Total	7,8 ± 1,3	38,2 ± 4,8 ###	33,3 ± 6,2
Neutrófilos	0,4 ± 0,2	28,9 ± 3,8 ###	23,5 ± 4,6
Macrófagos	7,3 ± 1,3	9,3 ± 1,9	9,8 ± 1,6

Os valores representam a média e o erro padrão da média x 10<sup>3</sup> células. ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6; CMC+CG n = 7; CG+NIA 600 mg/Kg n = 7).

### **Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção de zimosano na cavidade pleural**

Assim como nos protocolos envolvendo a nicotinamida, a dose de zimosano de 200 µg/cavidade (**Figura 9**) foi utilizada em todos os procedimentos em que os animais foram tratados com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg).

Para avaliar se o tratamento com essa vitamina também inibe a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos induzida por zimosano (200 µg/cavidade), os animais foram tratados com ácido nicotínico nas doses de 150, 300, 600 mg/Kg, 30 min antes e 1 h após o desafio com zimosano. Todas as doses do ácido nicotínico reduziram a migração de neutrófilos (**Figura 21**). O número total de leucócitos não foi reduzido pelo tratamento com ácido nicotínico, já o número de células mononucleares foi reduzido após tratamento com as três doses do ácido nicotínico (**Tabela 15**).



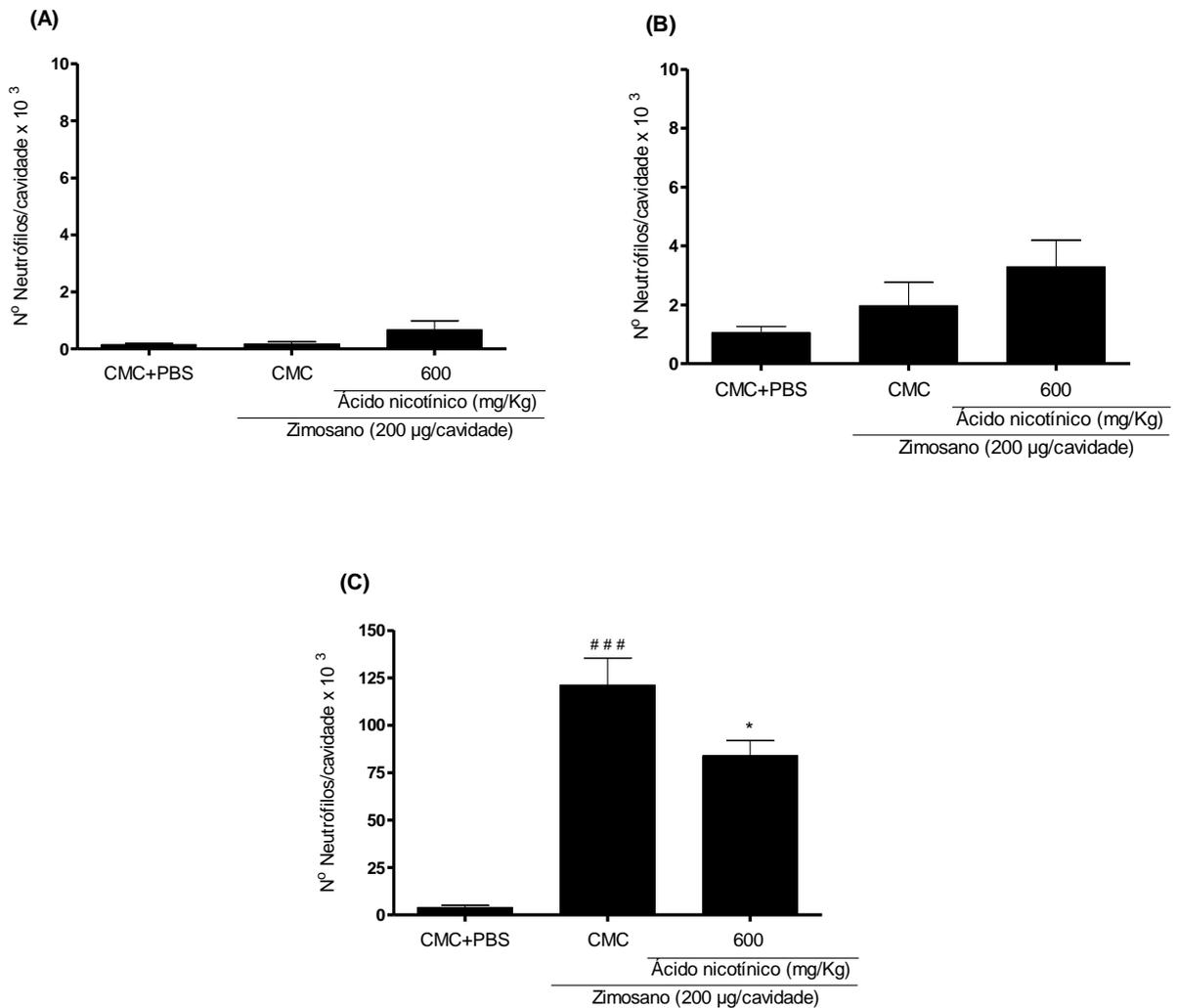
**Figura 21. Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (150, 300 ou 600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com zimosano (200 µg/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+ZYM); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS).  $n=6$ .

**Tabela 15. Efeito induzido pelo pré e pós-tratamento com ácido nicotínico sobre a migração de leucócitos induzida pela administração i.pl. de zimosano.**

	CMC + PBS	Zimosano 200 µg/cavidade			
		CMC	Ácido nicotínico (mg/Kg)		
			150	300	600
Total	6,6 ± 1,3	115,2 ± 15,7###	82,6 ± 15,6	81,6 ± 13,1	84,9 ± 11,3
Neutrófilos	0,06 ± 0,01	94,3 ± 12,1###	70,7 ± 11,2*	70,2 ± 11,2*	72,3 ± 9,1*
Macrófagos	6,6 ± 1,3	20,9 ± 4,1###	11,7 ± 1,6***	11,4 ± 1,9***	12,5 ± 2,9***

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \* e \*\*\* representam respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+ZYM); ### representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS).  $n=6$ .

A cinética de migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos desafiados com zimosano e tratados com ácido nicotínico também foi avaliada. De maneira semelhante ao que foi realizado no protocolo envolvendo a nicotinamida, os animais foram pré- e pós-tratados com o ácido nicotínico (600 mg/Kg) 30 min antes e 1 h após desafio com zimosano (200 µg/cavidade). Os animais foram divididos em grupos e eutanasiados 30 min, 2 h e 4 h após a injeção de zimosano. Dessa forma, os animais eutanasiados 30 min após o desafio receberam apenas o primeiro tratamento com ácido nicotínico. Nos animais tratados com essa vitamina, o número de neutrófilos presentes na cavidade pleural foi reduzido apenas na quarta hora após a injeção com zimosano (**Figura 22**). O número total de leucócitos também foi reduzido apenas na quarta hora e o número de células mononucleares não sofreu variação (**Tabela 16**).



**Figura 22. Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano, em diferentes momentos.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com zimosano (200 µg/cavidade). As figuras (A), (B) e (C) indicam o número de neutrófilos encontrados na cavidade pleural dos animais eutanasiados 0,5 - 2 e 4 h, respectivamente, após a injeção de zimosano. Os animais eutanasiados 0,5 h após a injeção de zimosano receberam apenas o primeiro tratamento com o ácido nicotínico. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+ZYM); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). Número de animais por grupo no intervalo de: **0,5 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=9, NIA+ZYM n=9); **2 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=8; NIA+ZYM n=8) e **4 h** (CMC+PBS n= 8, CMC+ZYM n=6, NIA+ZYM n=8).

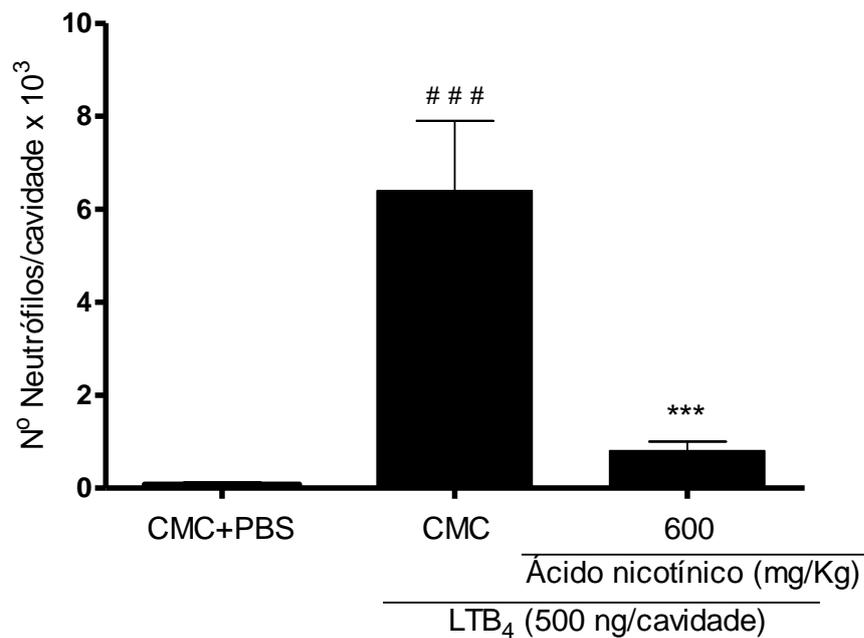
**Tabela 16.** Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de zimosano.

		CMC + PBS	Zimosano 200 µg/cavidade	
			CMC	NIA (600 mg/Kg)
0,5 h	Total	11,9 ± 2,2	8,5 ± 1,1	10,0 ± 1,6
	Neutrófilos	0,1 ± 0,02	0,1 ± 0,05	0,4 ± 0,2
	Macrófagos	11,7 ± 2,1	8,4 ± 1,0	9,4 ± 1,4
2 h	Total	11,6 ± 1,5	13,9 ± 2,4	16,8 ± 1,9
	Neutrófilos	1,0 ± 0,2	1,9 ± 0,8	3,3 ± 0,8
	Macrófagos	10,6 ± 1,5	12,0 ± 1,8	13,5 ± 1,8
4 h	Total	13,0 ± 3,1	134,7 ± 15,1 <sup>###</sup>	100,72 ± 9,9 <sup>***</sup>
	Neutrófilos	4,0 ± 1,1	121,1 ± 14,1 <sup>###</sup>	83,9 ± 8,0 <sup>*</sup>
	Macrófagos	9,0 ± 2,0	13,5 ± 2,2	16,7 ± 3,1

Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \* e \*\*\* representam respectivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+ZYM); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). Número de animais por grupo no intervalo de: **0,5 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=9, NIA+ZYM n=9); **2 h** (CMC+PBS n=9, CMC+ZYM n=8; NIA+ZYM n=8) e **4 h** (CMC+PBS n= 8, CMC+ZYM n=6, NIA+ZYM n=8).

### **Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela injeção de LTB<sub>4</sub> ou IL-8 na cavidade pleural**

Para avaliar se o ácido nicotínico também seria eficaz em inibir a migração de neutrófilos induzida por agentes quimiotáticos para neutrófilos, LTB<sub>4</sub> e IL-8 foram utilizados. No primeiro protocolo, os animais foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 30 min antes e 1 h após o desafio com LTB<sub>4</sub> (500 ng/cavidade). O número de leucócitos que migraram para a cavidade pleural dos camundongos foi avaliado 4 h após o tratamento com o agente flogogênico. O duplo tratamento com ácido nicotínico reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos animais induzida pelo LTB<sub>4</sub> (**Figura 23**). O número total de leucócitos presente na cavidade pleural dos animais desafiados com LTB<sub>4</sub> e tratados com ácido nicotínico também sofreu redução. O número de macrófagos não foi alterado pela injeção do agente quimiotático (**Tabela 17**).



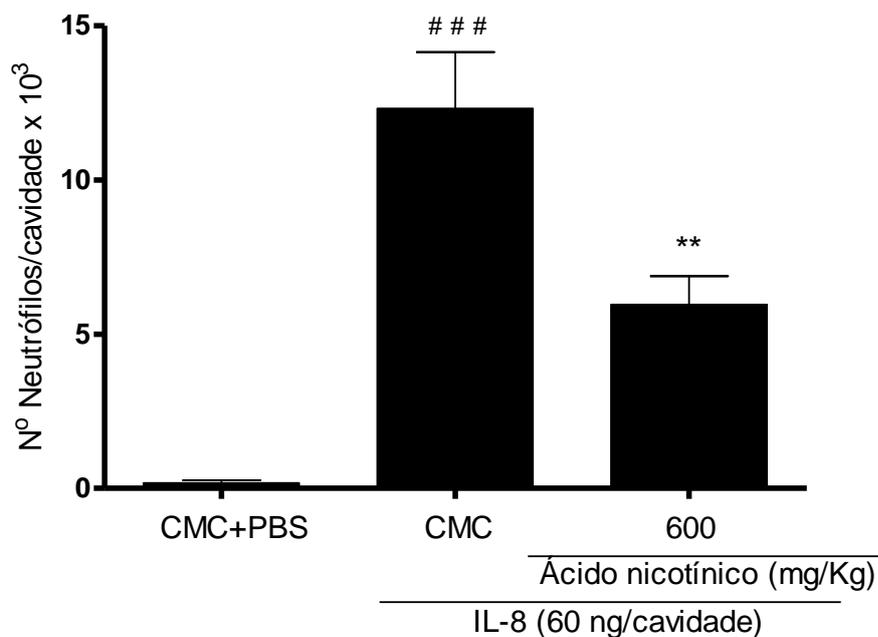
**Figura 23.** Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de LTB<sub>4</sub>. Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com LTB<sub>4</sub> (500 ng/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio com LTB<sub>4</sub>. \*\*\* representa p<0,001 em relação a (CMC+LTB<sub>4</sub>); ### representa p<0,001 em relação a (CMC+PBS). n=10.

**Tabela 17.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com ácido nicotínico 4 h após administração i.pl de LTB<sub>4</sub>.

	CMC + PBS	LTB <sub>4</sub> 500 ng/cavidade	
		CMC	NIA (600 mg/Kg)
Total	4,7 ± 0,7	12,3 ± 1,5 ###	5,6 ± 0,7***
Neutrófilos	0,8 ± 0,2	6,4 ± 1,5 ###	0,8 ± 0,2***
Macrófagos	4,6 ± 0,7	5,9 ± 1,1	4,6 ± 0,5

Os valores representam a média e o erro padrão da média x10<sup>3</sup> células. \*\*\* represente p<0,001 em relação a (CMC+LTB<sub>4</sub>); ### representa p<0,001 em relação a (CMC+PBS). n=10.

Em outro protocolo, os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 30 min antes do desafio com IL-8 (60 ng/cavidade), sendo que, um segundo tratamento foi realizado 1 h após o desafio. O número de leucócitos presentes na cavidade pleural dos camundongos foi avaliado 4 h após a injeção de IL-8. Assim como foi observado com os animais desafiados com LTB<sub>4</sub>, o duplo tratamento com ácido nicotínico inibiu a migração de neutrófilos induzidas pela injeção de IL-8 (**Figura 24**). A injeção de IL-8 não modificou o número total de leucócitos ou de células mononucleares presentes na cavidade pleural dos camundongos (**Tabela 18**).



**Figura 24. Efeito induzido pelos pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico sobre a migração de neutrófilos induzida pela administração i.pl. de IL-8.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com IL-8 (60 ng/cavidade). O número de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos animais foi avaliado 4 h após o desafio com IL-8. \*\* representa  $p < 0,01$  em relação a (CMC+IL-8); # # # representa  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6; CMC+ IL-8 n= 7; IL-8+NIA 600 mg/Kg n= 7).

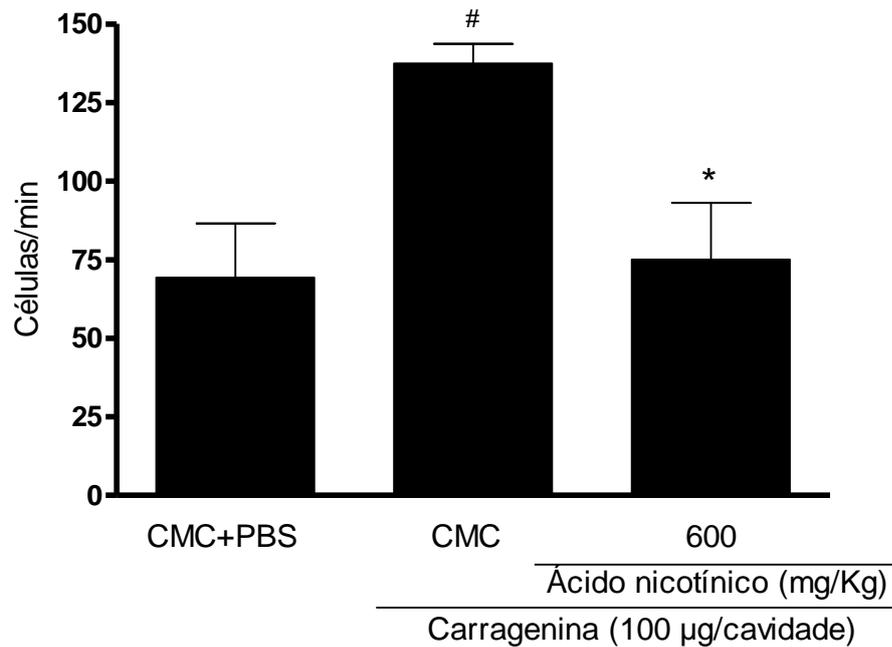
**Tabela 18.** Leucócitos presentes na cavidade pleural de camundongos tratados com ácido nicotínico 4 h após administração i.pl. de interleucina-8.

	CMC + PBS	IL-8 60 ng/cavidade	
		CMC	NIA (600 mg/Kg)
Total	7,4 ± 1,8	18,1 ± 2,3 ##	12,4 ± 0,7
Neutrófilos	0,1 ± 0,09	12,3 ± 1,5 ###	5,9 ± 0,9**
Macrófagos	7,2 ± 1,7	5,8 ± 0,6	6,4 ± 0,5

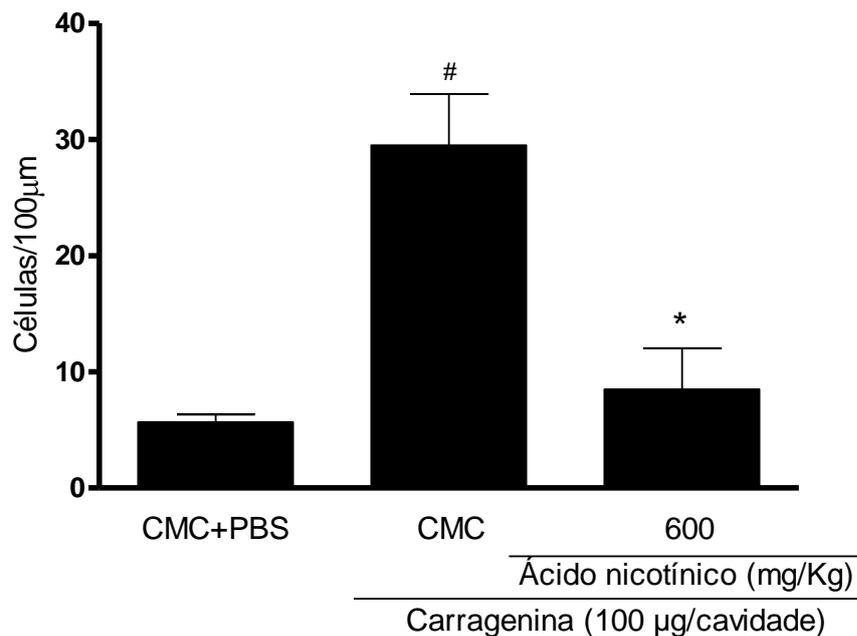
Os valores representam a média e o erro padrão da média  $\times 10^3$  células. \*\* representa  $p < 0,01$  em relação a (CMC+IL-8); ## e ### representam respectivamente  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 6; CMC+ IL-8 n = 7; IL-8+NIA 600 mg/Kg n = 7).

#### **Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre o rolamento e adesão de neutrófilos na microcirculação do músculo cremaster**

A técnica de microscopia intravital foi aplicada em animais desafiados com carragenina (100  $\mu\text{g}$ /cavidade) e tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg), com o objetivo de entender como essa vitamina interfere no processo de migração de leucócitos. Desta forma, os animais receberam injeções de carragenina (100  $\mu\text{g}$ ) diretamente na bolsa escrotal, sendo que o tratamento com ácido nicotínico foi realizado 0,5 h antes e 1 h após o desafio. O ácido nicotínico inibiu tanto o rolamento (**Figura 25**) quanto a adesão (**Figura 26**) de leucócitos ao endotélio na microcirculação do músculo cremaster.



**Figura 25. Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre o rolamento de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzido pela administração local de carragenina.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (100 µg/cavidade-i.sc.). As imagens foram coletadas 4 h após a injeção de carragenina. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+CG); # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 3; CMC+CG n = 4; CG+NIA 600 mg/Kg n = 4).

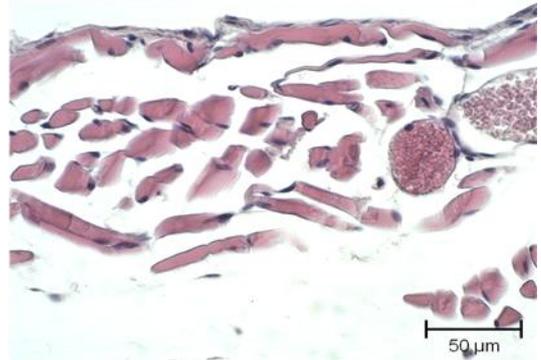
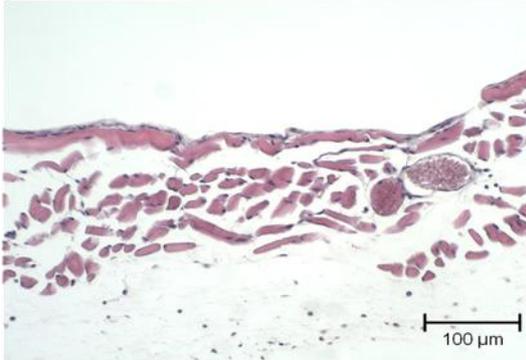


**Figura 26. Efeito induzido pelo ácido nicotínico sobre a adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster induzida pela administração local de carragenina.** Os camundongos foram tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg) 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (100 µg/cavidade-i.sc.). As imagens foram coletadas 4 h após a injeção de carragenina. \* representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+CG); # representa  $p < 0,05$  em relação a (CMC+PBS). (CMC+PBS n = 3; CMC+CG n = 4; CG+NIA 600 mg/Kg n = 4).

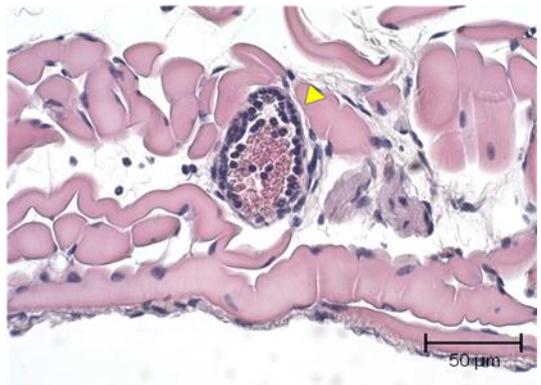
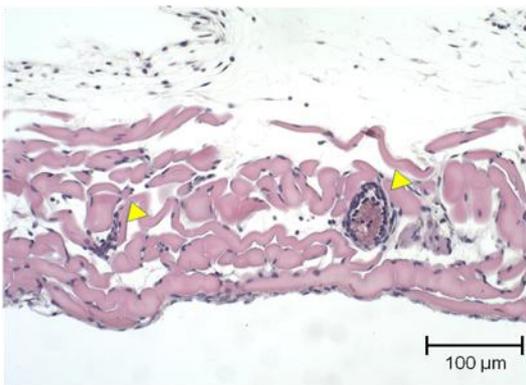
Assim como foi realizado nos animais tratados com nicotinamida, o músculo cremaster dos animais tratados com ácido nicotínico e desafiados com carragenina também foi recolhido para a confecção de lâminas histológicas. A análise qualitativa das lâminas revelou uma redução do número de leucócitos presentes na região intersticial do músculo cremaster dos camundongos que receberam o duplo tratamento com o ácido nicotínico (**Figura 27**).

**Cortes histológicos do músculo cremaster de camundongos tratados com ácido nicotínico.**

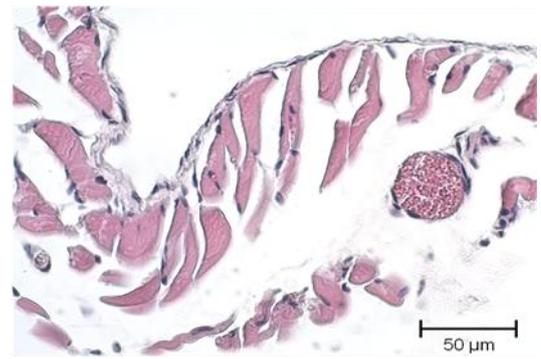
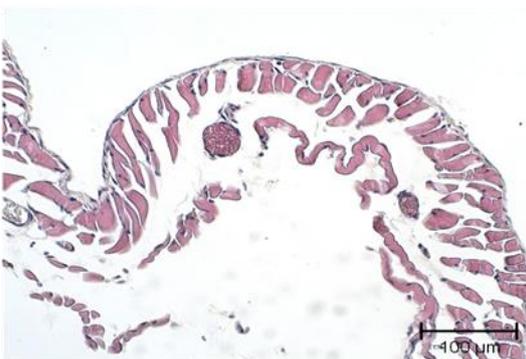
**(A) CMC+PBS**



**(B) CMC+CG**



**(C) CG+NIA**



**Aumento 100x**

**Aumento 200x**

**Figura 27. Avaliação da presença de leucócitos na região intersticial do músculo cremaster induzida pela injeção local de carragenina em camundongos tratados com ácido nicotínico.** Animais tratados com veículo (CMC); p.o. + injeção de salina (i.sc.) **(A)**. Animais tratados com veículo (CMC); p.o. + injeção de carragenina (100 µg/cavidade-i.sc.) **(B)**. Animais tratados com ácido nicotínico (600 mg/Kg); p.o., 0,5 h antes e 1 h após desafio com carragenina (100 µg/cavidade-i.sc.) **(C)**. Coloração: (HE).

## 6 DISCUSSÃO

A indução de pleurisia em murinos constitui um modelo de inflamação aguda bem estabelecido, sendo utilizada para o estudo de drogas com potencial em reduzir parâmetros inflamatórios como formação de exsudato, extravasamento de proteínas ou migração de leucócitos para tecidos inflamados (Ackerman *et al.*, 1980). O modelo é caracterizado pelo rápido influxo de polimorfonucleares, seguido pela infiltração de mononucleares, para a cavidade pleural dos animais (Murai *et al.*, 2003). Esse processo é regulado tanto por células mononucleares residentes (Cailhier *et al.*, 2006) como também pelo mesotélio (Antony, 2003), o qual é constituído por células epiteliais e forma a pleura, membrana que envolve o pulmão.

Tanto o tecido mesotelial como as células mononucleares residentes funcionam como gatilhos da resposta inflamatória, uma vez que, após alguma lesão liberam mediadores lipídicos, aminas e citocinas que irão ativar outras células, recrutando leucócitos da circulação, além de promover a expressão de moléculas de adesão tanto nas células do endotélio vascular como nos leucócitos (Antony, 2003; Cailhier *et al.*, 2006).

Várias substâncias são conhecidas por induzir a pleurisia em camundongos promovendo a liberação de diferentes mediadores inflamatórios. Em particular, na pleurisia induzida por carragenina, ocorre a liberação de mediadores lipídicos como PGs (Yuhki *et al.*, 2004), LTs (Raychaudhuri *et al.*, 1997), além de citocinas como TNF, IL-1, IL-6 e IL-8. Esses mediadores irão promover o acúmulo de neutrófilos e células mononucleares a partir dos vasos sanguíneos, além de ativar as células endoteliais (Frode *et al.*, 2001).

No presente estudo, inicialmente, foi utilizado o modelo de pleurisia induzida por carragenina para avaliar se o ácido nicotínico e a nicotinamida eram capazes de reduzir o número de neutrófilos na cavidade pleural de camundongos, uma vez que, alguns estudos demonstraram que essas vitaminas, além da função nutricional também apresentam propriedades anti-inflamatórias (Nagai *et al.*, 1994; Ungerstedt *et al.*, 2003; Godin *et al.*, 2011).

Para isto, um estudo para determinar as doses de carragenina capazes de induzir recrutamento de neutrófilos no modelo experimental de pleurisia foi realizado. A injeção desse estímulo induziu o recrutamento seletivo de neutrófilos, com exceção da menor dose testada (20 µg/mL). Dessa forma, foi padronizada a dose

intermediária desse agente flogogênico (200 µg/cavidade) para ser utilizada nos protocolos seguintes. Como era de se esperar, a injeção de carragenina não provocou a migração de mononucleares no intervalo de 4 h, uma vez que o fenômeno tem início na quinta hora após o desafio com carragenina, chegando ao pico no segundo dia. Por outro lado o acúmulo de neutrófilos tem início no intervalo de 3-5 h após o desafio com carragenina, com pico em 24 h, o que está de acordo com os resultados aqui apresentados (Murai *et al.*, 2003).

Uma vez definida a dose do agente flogogênico, os animais foram tratados com dose única de ácido nicotínico ou nicotinamida, 1 h antes da injeção com carragenina, sendo que a contagem de neutrófilos foi realizada 4 h após o desafio. Nesse caso, não foi observada redução do número de neutrófilos na cavidade pleural dos animais tratados com as vitaminas, o que pode ser explicado pelo rápido metabolismo dessas substâncias.

O ácido nicotínico e a nicotinamida são moléculas hidrossolúveis e rapidamente excretadas na urina. Essas vitaminas também podem sofrer metabolização hepática levando a formação de metabólitos inativos. A associação desses fatores explica a curta meia vida plasmática do ácido nicotínico e da nicotinamida. A meia vida média dessas vitaminas no sangue foi definida como sendo de 1,5 h para o ácido nicotínico e 6 h para a nicotinamida (Petrack *et al.*, 1966; Menon *et al.*, 2007). Dessa forma, é provável que durante o intervalo de 5 h, decorrido entre a administração das vitaminas e a eutanásia dos animais, tenha ocorrido a metabolização hepática e a excreção do ácido nicotínico e da nicotinamida através da urina. Assim, é possível que a administração de dose única das vitaminas não seja suficiente para proporcionar concentrações plasmáticas capazes de promover os esperados efeitos anti-inflamatórios.

Diante disso, o protocolo foi modificado seguindo o método empregado por outro grupo de pesquisadores (Nagai *et al.*, 1994). Neste caso, os animais receberam uma dose do ácido nicotínico (250, 500 ou 1000 mg/Kg) ou da nicotinamida (150, 300 ou 600 mg/Kg) 30 min antes e outra 1 h após a injeção de carragenina. Nesse novo protocolo, em que os animais receberam duas doses das vitaminas, foi observada redução na migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos camundongos, 4 h após o desafio com carragenina, reforçando a hipótese de que a falta de eficácia após administração única das vitaminas provavelmente está relacionada à curta meia vida plasmática dessas drogas.

Uma vez definida a dose do ácido nicotínico e da nicotinamida, bem como a forma de tratamento mais eficiente para inibir a migração de neutrófilos, a cinética dessa migração também foi avaliada. Para isto, os animais foram eutanasiados 30 min, 2 h ou 4 h após o desafio com carragenina. Nos animais eutanasiados 30 min após a administração do agente flogogênico, não foi observada migração de leucócitos, provavelmente devido ao curto intervalo entre a administração da carragenina e a eutanásia dos camundongos (Murai *et al.*, 2003).

Embora a migração de neutrófilos de maneira mais expressiva tenha início no intervalo de 3-5 h (Murai *et al.*, 2003), foi observada uma migração de neutrófilos significativa já na segunda hora após o desafio com carragenina, sendo esta migração inibida tanto pelo tratamento com ácido nicotínico como com nicotinamida. É possível que essas vitaminas inibam etapas iniciais importantes que funcionem como gatilho da resposta inflamatória, onde ocorre a expressão de moléculas de adesão, ativação das células mononucleares residentes, liberação de citocinas e quimiocinas, que irão ativar células epiteliais e leucócitos promovendo o rolamento e adesão ao epitélio vascular (Ungerstedt *et al.*, 2003; Grange *et al.*, 2009; Tavintharan *et al.*, 2009). Também foi observada redução na contagem de neutrófilos na cavidade pleural dos animais tratados com ácido nicotínico e nicotinamida 4 h após desafio com carragenina.

Uma vez que o tratamento duplo com as vitaminas conseguiu inibir a migração de leucócitos induzida por carragenina para a cavidade pleural de camundongos, foi avaliado se apenas o pós-tratamento também poderia provocar esse efeito. Essa avaliação é importante porque na maioria das vezes a utilização de fármacos para o tratamento de doenças ocorre quando o quadro inflamatório já está estabelecido. Desta forma, o tratamento dos animais foi realizado 2 h após o desafio com carragenina e não interferiu com a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos camundongos induzida por carragenina, o que está de acordo com a hipótese de que a ação do ácido nicotínico e da nicotinamida sobre a migração de neutrófilos pode estar relacionada à inibição de eventos que ocorrem no início da resposta inflamatória.

Além da carragenina, também foi utilizado o zimosano, uma substância formada principalmente por carboidratos originados da parede celular de leveduras, para induzir pleurisia. Além de estimular a liberação de citocinas (Utsunomiya *et al.*, 1998) e mediadores lipídicos (Kikuchi *et al.*, 1995), a injeção de zimosano promove

principalmente a ativação dos componentes do complemento (Imai *et al.*, 1991), estimulando a produção de mediadores que irão contribuir para o desenvolvimento da resposta inflamatória por meio de vias distintas daquelas evocadas pela carragenina.

Para avaliar a influencia do ácido nicotínico e da nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida pelo zimosano, foi realizado um estudo das doses de zimosano capazes de induzir recrutamento de neutrófilos. A administração desse agente flogogênico na dose de 200 µg/cavidade induziu migração comparável aquela induzida pela dose de 600 µg/cavidade. Dessa forma, a menor dose foi escolhida, uma vez que induziu migração consistente de neutrófilos.

Assim como ocorreu nos protocolos utilizando a carragenina, o tratamento com ácido nicotínico ou nicotinamida também inibiu a migração induzida por zimosano, porém duas diferenças observadas entre os ensaios utilizando o zimosano e a carragenina devem ser destacadas. Quando a carragenina foi utilizada como agente flogogênico, apenas a maior dose do ácido nicotínico ou da nicotinamida inibiu a migração de neutrófilos. Por outro lado, quando o agente inflamatório foi o zimosano, as três doses das vitaminas induziram redução na contagem de neutrófilos, não existindo diferença entre elas.

Um segundo ponto interessante foi que, embora a migração de neutrófilos promovida pela injeção de zimosano tenha sido muito mais intensa do que aquela induzida pela carragenina, o tratamento com a menor dose do ácido nicotínico e da nicotinamida inibiu essa migração. Dessa forma, os resultados apresentados neste estudo, sugerem uma possível ação dessas vitaminas sobre intermediários produzidos após a ativação do complemento, uma vez que já foi muito bem definido que a resposta inflamatória induzida pelo zimosano está em grande parte relacionada à ativação desse sistema (Pillemer *et al.*, 1954; Imai *et al.*, 1991).

Também foi realizado um estudo da cinética de migração de neutrófilos induzida pela injeção de zimosano, sendo que os intervalos para a eutanásia dos animais foram mantidos em 30 min, 2 h e 4 h após a injeção desse agente flogogênico. Nesse caso, a contagem de neutrófilos 30 min e 2 h após o desafio com zimosano foi muito baixa não existindo diferença entre os grupos tratados e não tratados. É possível que a necessidade da ativação do complemento seja responsável por retardar o inicio do processo de migração de neutrófilos para a quarta hora, uma vez que quando o agente flogogênico utilizado foi a carragenina já

na segunda hora foi observada inibição da migração de neutrófilos nos animais tratados com as vitaminas. Nos camundongos eutanasiados 4 h após a injeção de zimosano, o tratamento com as vitaminas reduziu a contagem de neutrófilos na cavidade pleural, o que está de acordo com o protocolo anterior.

De maneira geral, o ácido nicotínico e nicotinamida inibiram a migração de neutrófilos, tanto nos modelos de pleurisia induzida por carragenina, como por zimosano. Isso pode ser justificado uma vez que, em outros modelos experimentais, o tratamento com essas vitaminas reduz a produção de citocinas inflamatórias (Ungerstedt *et al.*, 2003; Grange *et al.*, 2009), além de inibir a expressão de moléculas de adesão *in vitro* (Tavintharan *et al.*, 2007; Tavintharan *et al.*, 2009) e a migração de neutrófilos (Nagai *et al.*, 1994).

O tratamento com as vitaminas também é capaz de inibir as enzimas da família PARP (Ungerstedt *et al.*, 2003) que podem modular diretamente a síntese de mediadores inflamatórios (Szabo *et al.*, 1997) ou atuar indiretamente por meio da modulação da atividade de NF- $\kappa$ B, fator de transcrição celular que regula a síntese de mediadores inflamatórios e a expressão de moléculas de adesão (Hassa *et al.*, 2002; Karin *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram que o tratamento com ácido nicotínico ou nicotinamida inibe diretamente a ativação de NF- $\kappa$ B (Pero *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2011).

Para estudar se os efeitos induzidos pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre o recrutamento de neutrófilos induzido por carragenina e zimosano no modelo de pleurisia envolvem alterações na microcirculação adjacente ao tecido, foi realizado um estudo utilizando a técnica de microscopia intravital em animais desafiados com carragenina. Para esse estudo, os camundongos receberam pré- e pós-tratamentos com ácido nicotínico ou com nicotinamida, a fim de avaliar o efeito induzido por essas vitaminas sobre os processos de adesão e rolamento de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster. Os resultados claramente demonstram que tanto o rolamento quanto a adesão de leucócitos ao endotélio vascular foram reduzidos pelo tratamento com essas vitaminas.

Como forma de validar os resultados obtidos por meio da microscopia intravital, o músculo cremaster foi extraído dos camundongos para a confecção de lâminas histológicas, sendo que a análise qualitativa dessas lâminas demonstrou claramente uma redução de leucócitos na região intersticial desse tecido nos

animais tratados com as vitaminas. Esse achado também está de acordo com os resultados encontrados no modelo de pleurisia, pois, independente do agente flogogênico utilizado, o tratamento com as vitaminas reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural.

Apesar da diferença em relação ao local de avaliação dos processos de migração, rolamento e adesão, uma vez que, esses parâmetros foram avaliados em tecidos diferentes, acreditamos não existirem diferenças significativas em relação aos mecanismos que controlam a transmigração celular na microcirculação pulmonar ou no músculo cremaster, permitindo inferir que a redução na contagem de neutrófilos presentes na cavidade pleural dos camundongos, desafiados com carragenina e ou zimosano e tratados com as vitaminas, pode ser explicada, pelo menos em parte, pela redução da adesão e rolamento dos neutrófilos na microcirculação pulmonar.

Os resultados apresentados neste estudo corroboram resultados encontrados por outros grupos, que demonstraram que o ácido nicotínico reduz a adesão de monócitos *in vitro* por inibir a expressão de moléculas de adesão induzidas por IL-1 $\beta$  e TNF (Tavintharan *et al.*, 2009). O tratamento com essa vitamina também inibiu a contagem de neutrófilos no lavado bronco-alveolar de cobaias induzido por LPS (Nagai *et al.*, 1994). Por sua vez, é possível que o tratamento com nicotinamida reduza a migração de neutrófilos de maneira indireta, uma vez que a nicotinamida é um conhecido inibidor de PARP (Ungerstedt *et al.*, 2003), sendo que, animais deficientes para essa família de enzimas apresentam redução na adesão e migração de neutrófilos induzida por zimosano (Szabo *et al.*, 1997).

Ainda com relação à nicotinamida, foi demonstrado que o tratamento com a vitamina inibiu a atividade da enzima Miosina Endotelial de Cadeia Leve (MLCK) conhecida por fosforilar filamentos de miosina e, com isso, promover modificações no citoesqueleto das células endoteliais (Ruddock *et al.*, 2004). A ativação da enzima MLCK também se mostrou importante no processo de migração de neutrófilos (Saito *et al.*, 2002), sendo que sua ativação parece ser dependente do contato dos neutrófilos com as células endoteliais (Yuan *et al.*, 2002). Também tem sido demonstrado que o correto funcionamento da enzima é importante na ativação de eventos que irão modular o citoesqueleto, permitindo o correto posicionamento de integrinas, importantes moléculas para a adesão celular, favorecendo o processo de migração (Garcia *et al.*, 1998; Wittchen, 2009). Desta forma, é possível que a

inibição da atividade da enzima MLCK provocada pelo tratamento com nicotinamida possa, pelo menos em parte, explicar os resultados apresentados neste trabalho.

Uma vez que o ácido nicotínico e a nicotinamida inibiram a migração de neutrófilos em um modelo de pleurisia induzida por carragenina e por zimosano e os processos de rolamento e adesão induzidos por carragenina no músculo cremaster de camundongos, também foi investigado se o tratamento com essas vitaminas poderia reduzir a migração de neutrófilos induzida por agentes quimiotáticos específicos.

Para isto utilizamos IL-8, importante quimiocina liberada em um contexto inflamatório e que participa dos processos de ativação celular, expressão de moléculas de adesão, além de ser conhecida como o mais potente agente quimiotático para neutrófilos (Baggiolini *et al.*, 1992; Lomakina *et al.*, 2010). Porém, mesmo após injeção de IL-8, o tratamento com o ácido nicotínico ou com a nicotinamida inibiu a migração de neutrófilos para a cavidade pleural dos camundongos, demonstrando o potencial anti-inflamatório dessas vitaminas.

Este resultado pode ser parcialmente explicado pela capacidade do ácido nicotínico e da nicotinamida em reduzir o rolamento e a adesão de leucócitos induzidos pela injeção de carragenina. Mesmo não realizando um protocolo em que o rolamento e adesão fossem induzidos pela injeção de IL-8, é possível inferir que o tratamento com as vitaminas foi capaz de reduzir o rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação pulmonar, independente do agente flogogênico utilizado, tendo como consequência redução da contagem de neutrófilos na cavidade pleural dos camundongos.

O efeito inibitório induzido pelo ácido nicotínico e pela nicotinamida sobre a produção de outros mediadores inflamatórios (Pero *et al.*, 1999; Ungerstedt *et al.*, 2003; Grange *et al.*, 2009), sobre a expressão de moléculas de adesão (Ganji *et al.*, 2009; Tavintharan *et al.*, 2009), sobre a enzima MLCK (Saito *et al.*, 2002) e sobre a ativação de PARP (Ungerstedt *et al.*, 2003) e NF- $\kappa$ B (Pero *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2011) também pode contribuir para explicar a ação dessas vitaminas sobre a pleurisia induzida por IL-8.

De maneira semelhante ao que ocorreu com IL-8, o tratamento com ácido nicotínico e com nicotinamida também inibiu a migração de neutrófilos estimulada por LTB<sub>4</sub>, um agente quimiotático para neutrófilos (Martel-Pelletier *et al.*, 2003) que

também induz a produção de citocinas (Chou *et al.*, 2010) e estimula a síntese de moléculas de adesão (Seo *et al.*, 2001), contribuindo para a migração de neutrófilos para locais inflamados. Desta forma, é possível que o potencial do ácido nicotínico e da nicotinamida em reduzir a migração de neutrófilos induzida por LTB<sub>4</sub>, assim como, quando o agente quimiotático utilizado foi IL-8, também possa estar relacionado à capacidade dessas vitaminas em inibir o rolamento e a adesão de leucócitos, a atividade de MLCK, PARP e NF- $\kappa$ B, além da redução na expressão de moléculas de adesão.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que o pré- e o pós-tratamentos com ácido nicotínico ou com a nicotinamida inibem a migração de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos desafiados com agentes flogogênicos que evocam a participação de diferentes mediadores inflamatórios ou com agentes quimiotáticos seletivos para neutrófilos. O tratamento com as vitaminas também foi eficaz em reduzir os processos de rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação do músculo cremaster de camundongos induzidos por carragenina. Essas ações sugerem um possível envolvimento dessas vitaminas na inibição de eventos que controlam a expansão inicial da resposta inflamatória, sendo possível ainda, que mecanismos envolvendo outras moléculas importantes, como MLCK, PARP e NF- $\kappa$ B, além da inibição de moléculas de adesão, estejam envolvidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN, N. et al. Three day pleural inflammation: a new model to detect drug effects on macrophage accumulation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 215, n. 3, p. 588-95, Dec 1980.
- ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **Eur Respir J**, v. 21, n. 3, p. 539-44, Mar 2003.
- BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Lett**, v. 307, n. 1, p. 97-101, Jul 27 1992.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 625-55, 1989.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-75, Feb 2003.
- BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1033-6, Dec 20 1991.
- BYRUM, R. S. et al. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. **J Immunol**, v. 163, n. 12, p. 6810-9, Dec 15 1999.
- CAILHIER, J. F. et al. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 5, p. 540-7, Mar 1 2006.
- CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **J Cell Biol**, v. 167, n. 2, p. 377-88, Oct 25 2004.
- CHOU, R. C. et al. Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 266-78, Aug 27 2010.
- COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 4, p. 487-95, Apr 2005.
- FENG, D. et al. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. **J Exp Med**, v. 187, n. 6, p. 903-15, Mar 16 1998.
- FRANCISCHI, J. N. et al. Pharmacological characterization of Sephadex-induced oedema in rat paws: predominant role of serotonin and platelet-activating factor. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 109, n. 4, p. 398-406, Apr 1996.
- FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, Feb 7 2001.
- GANJI, S. H. et al. Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 1, p. 68-75, Jan 2009.

- GARCIA, J. G. et al. Adherent neutrophils activate endothelial myosin light chain kinase: role in transendothelial migration. **J Appl Physiol**, v. 84, n. 5, p. 1817-21, May 1998.
- GODIN, A. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and its isomers in different experimental models. **Pharmacol Biochem Behav**, Jul 8 2011.
- GRANGE, P. A. et al. Nicotinamide inhibits Propionibacterium acnes-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF-kappaB and MAPK pathways. **J Dermatol Sci**, v. 56, n. 2, p. 106-12, Nov 2009.
- GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J Leukoc Biol**, v. 55, n. 5, p. 662-75, May 1994.
- HASSA, P. O.; HOTTIGER, M. O. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 9, p. 1534-53, Sep 2002.
- HENKELS, K. M. et al. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). **FEBS Lett**, v. 585, n. 1, p. 159-66, Jan 3 2011.
- IMAI, Y.; HAYASHI, M.; OH-ISHI, S. Key role of complement activation and platelet-activating factor in exudate formation in zymosan-induced rat pleurisy. **Jpn J Pharmacol**, v. 57, n. 2, p. 225-32, Oct 1991.
- ISSEKUTZ, A. C.; ISSEKUTZ, T. B. Cellular and vascular phenomena in inflammation. **Methods Enzymol**, v. 162, p. 301-20, 1988.
- KAPLAN, A. P.; GHEBREHIWET, B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. **Mol Immunol**, v. 47, n. 13, p. 2161-9, Aug 2010.
- KARIN, M.; YAMAMOTO, Y.; WANG, Q. M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 1, p. 17-26, Jan 2004.
- KEMPF, T. et al. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. **Nat Med**, v. 17, n. 5, p. 581-8, May 2011.
- KIKUCHI, M.; TSUZURAHARA, K.; NAITO, K. Involvement of leukotriene B4 in zymosan-induced rat pleurisy: inhibition of leukocyte infiltration by the 5-lipoxygenase inhibitor T-0757. **Biol Pharm Bull**, v. 18, n. 9, p. 1302-4, Sep 1995.
- KIM, P. K.; DEUTSCHMAN, C. S. Inflammatory responses and mediators. **Surg Clin North Am**, v. 80, n. 3, p. 885-94, Jun 2000.
- KIRKLAND, J. B. Niacin status, NAD distribution and ADP-ribose metabolism. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 1, p. 3-11, 2009.
- KOSTYLINA, G. et al. Neutrophil apoptosis mediated by nicotinic acid receptors (GPR109A). **Cell Death Differ**, v. 15, n. 1, p. 134-42, Jan 2008.
- KWON, W. Y. et al. Niacin attenuates lung inflammation and improves survival during sepsis by downregulating the nuclear factor-kappaB pathway. **Crit Care Med**, v. 39, n. 2, p. 328-34, Feb 2011.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-89, Sep 2007.

LOMAKINA, E. B.; WAUGH, R. E. Signaling and Dynamics of Activation of LFA-1 and Mac-1 by Immobilized IL-8. **Cell Mol Bioeng**, v. 3, n. 2, p. 106-116, Jun 1 2010.

LUK, T.; MALAM, Z.; MARSHALL, J. C. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 804-16, Apr 2008.

MARLIN, S. D.; SPRINGER, T. A. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). **Cell**, v. 51, n. 5, p. 813-9, Dec 4 1987.

MARTEL-PELLETIER, J. et al. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 6, p. 501-9, Jun 2003.

MENON, R. M. et al. Plasma and urine pharmacokinetics of niacin and its metabolites from an extended-release niacin formulation. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v. 45, n. 8, p. 448-54, Aug 2007.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab Invest**, v. 82, n. 5, p. 521-33, May 2002.

MURAI, N. et al. Concurrent evolution and resolution in an acute inflammatory model of rat carrageenin-induced pleurisy. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 4, p. 456-63, Apr 2003.

NAGAI, A. et al. Niacin attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in the hamster. **Eur Respir J**, v. 7, n. 6, p. 1125-30, Jun 1994.

PENG, Q. et al. The role of anaphylatoxins C3a and C5a in regulating innate and adaptive immune responses. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 236-46, Jul 2009.

PERO, R. W. et al. Newly discovered anti-inflammatory properties of the benzamides and nicotinamides. **Mol Cell Biochem**, v. 193, n. 1-2, p. 119-25, Mar 1999.

PETRACK, B.; GREENGARD, P.; KALINSKY, H. On the relative efficacy of nicotinamide and nicotinic acid as precursors of nicotinamide adenine dinucleotide. **J Biol Chem**, v. 241, n. 10, p. 2367-72, May 25 1966.

PILLEMER, L. et al. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**, v. 120, n. 3112, p. 279-85, Aug 20 1954.

RAYCHAUDHURI, A. et al. Inhibition of LTB<sub>4</sub> biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 355, n. 4, p. 470-4, Apr 1997.

RECHSTEINER, M.; HILLYARD, D.; OLIVERA, B. M. Magnitude and significance of NAD turnover in human cell line D98/AH2. **Nature**, v. 259, n. 5545, p. 695-6, Feb 26 1976.

REVOLLO, J. R.; GRIMM, A. A.; IMAI, S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 49, p. 50754-63, Dec 3 2004.

- ROSEN, S. D. Cell surface lectins in the immune system. **Semin Immunol**, v. 5, n. 4, p. 237-47, Aug 1993.
- RUDDOCK, M. W.; HIRST, D. G. Nicotinamide relaxes vascular smooth muscle by inhibiting myosin light chain kinase-dependent signaling pathways: implications for anticancer efficacy. **Oncol Res**, v. 14, n. 10, p. 483-9, 2004.
- SAITO, H. et al. Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. **J Leukoc Biol**, v. 72, n. 4, p. 829-36, Oct 2002.
- SEO, S. M.; MCINTIRE, L. V.; SMITH, C. W. Effects of IL-8, Gro-alpha, and LTB(4) on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 5, p. C1568-78, Nov 2001.
- SHAW, S. K. et al. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 2323-30, Aug 15 2001.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-14, Jan 28 1994.
- SZABO, C. et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. **J Exp Med**, v. 186, n. 7, p. 1041-9, Oct 6 1997.
- TAVINTHARAN, S.; LIM, S. C.; SUM, C. F. Effects of niacin on cell adhesion and early atherogenesis: biochemical and functional findings in endothelial cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 3, p. 206-10, Mar 2009.
- TAVINTHARAN, S. et al. Niacin affects cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 cells. **Clin Chim Acta**, v. 376, n. 1-2, p. 41-4, Feb 2007.
- UNGERSTEDT, J. S.; BLOMBACK, M.; SODERSTROM, T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. **Clin Exp Immunol**, v. 131, n. 1, p. 48-52, Jan 2003.
- UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; OH-ISHI, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. **Cytokine**, v. 10, n. 12, p. 956-63, Dec 1998.
- VAN GOOL, F. et al. Intracellular NAD levels regulate tumor necrosis factor protein synthesis in a sirtuin-dependent manner. **Nat Med**, v. 15, n. 2, p. 206-10, Feb 2009.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, n. 25, p. 232-5, Jun 23 1971.
- WITTCHEN, E. S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. **Front Biosci**, v. 14, p. 2522-45, 2009.
- YANG, X. D. et al. Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 3, p. 401-10, Sep 1999.
- YUAN, S. Y. et al. Myosin light chain phosphorylation in neutrophil-stimulated coronary microvascular leakage. **Circ Res**, v. 90, n. 11, p. 1214-21, Jun 14 2002.

YUHKI, K. et al. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 311, n. 3, p. 1218-24, Dec 2004.

ZIEGLER, M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 6, p. 1550-64, Mar 2000.

## **Anexo**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- CETEA -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 24/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo do efeito do ácido nicotínico e da nicotinamida sobre a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos inflamatórios em modelos experimentais de inflamação**", que tem como responsável(is) **André Klein**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **30/ 03/2011**.

Este certificado expira-se em **30/ 03/ 2016**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 24/2011**, related to the project entitled "**Study of the effect of nicotinic acid and nicotinamide on the neutrophil migration induced by different inflammatory stimuli in experimental inflammation models**", under the supervisors of **André Klein**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 30, 2011**.

This certificate expires in **March 30, 2016**.

Belo Horizonte, 4 de Abril de 2011.

**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 8627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@ccps.ufmg.br](mailto:cetea@ccps.ufmg.br)