

Artigo Original

Efeitos da melatonina na inflamação de vias aéreas em modelos experimentais de asma, DPOC e de sobreposição Asma-DPOC

Effects of melatonin on airway inflammation in experimental models of asthma, COPD and the asthma-COPD overlap

Vitório Crema Scheffer¹, Cristiane de Cássia Ribeiro², Leandro Camargo³,
Edna Aparecida Leick¹, Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério¹

Scheffer VC, Ribeiro CC, Camargo L, Leick EA, Tibério IFLC. Efeitos da Melatonina na inflamação de vias aéreas em modelos experimentais de asma, DPOC e de sobreposição Asma-DPOC / *Effects of melatonin on airway inflammation in experimental models of asthma, COPD and the asthma-COPD overlap*. Rev Med (São Paulo). 2023 jan.-fev.;102(1 ed. esp.):e-204645.

RESUMO: Justificativa e Objetivos: De acordo com estudos anteriores, a melatonina, uma indolamina, pode possivelmente reduzir a dispnéia em pacientes que apresentam asma ou DPOC. Adicionalmente, foi provado igualmente, através dos estudos experimentais, que a molécula joga possivelmente um papel antiinflamatório, porque pôde inibir a transcrição de NFκ-B em modelos experimentais da asma e do COPD. Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da melatonina em modelos experimentais de asma, DPOC e Sobreposição da Asma-DPOC (ACO). Métodos: 64 camundongos foram divididos em 8 grupos, a fim de induzir DPOC (grupo “ELA”), asma (“OVA”) ou ACO (“ACO”). O grupo controle (“SAL”) recebeu solução salina. Os grupos de tratamento (“+MEL”) foram submetidos aos dois protocolos de doença e também receberam Melatonina (intraperitonealmente). Após os protocolos, foram avaliados o óxido nítrico exalado (Eno), bem como as células totais e diferenciais do fluido do lavado broncoalveolar. Resultados: OVA+MEL (11.3±1.65ppb) apresentou redução em eNO em comparação a OVA (24.17±4.30ppb). Além disso, OVA+MEL (11.3±1.65x10⁴ céls./mL) e ACO+MEL (2.17±0.63x10⁴ céls./mL) apresentaram redução na quantidade de células totais em comparação a OVA (25.70±4.59x10⁴ céls./mL) e ACO (14.33±3.11x10⁴ céls./mL), respectivamente. Houve queda na contagem de eosinófilos em OVA+MEL (5.37±1.41x10⁴ céls./

mL) e em ACO+MEL (0.87±0.36x10⁴ céls./mL) em comparação a OVA (18.67±4.01x10⁴ céls./mL) e ACO (1.45±0.41x10⁴ céls./mL), respectivamente. Adicionalmente, o número de linfócitos apresentou redução em OVA+MEL (1.00±0.24x10⁴ céls./mL) em comparação a OVA (3.94±1.15x10⁴ céls./mL). O número de macrófagos também apresentou redução em OVA+MEL (3.09±0.39x10⁴ céls./mL) e em ACO+MEL (1.10±0.27x10⁴ céls./mL) em comparação a OVA (7.26±1.93x10⁴ céls./mL) e ACO (6.41±1.54x10⁴ céls./mL), respectivamente (p<0.05 para todas as comparações). Não houve diferença na comparação da contagem de neutrófilos nos diferentes grupos analisados. Conclusão: O tratamento com melatonina mostrou-se, em modelo experimental de asma e ACO, efetivo na redução de parâmetros pró-inflamatórios, podendo representar um papel importante no controle de tais patologias. Além disso, o tratamento com melatonina em modelos experimentais de lesão pulmonar induzida por elastase não se mostrou eficaz no controle de parâmetros pró-inflamatórios no fluido do lavado broncoalveolar, sendo necessários mais estudos para o entendimento dos mecanismos de ação da melatonina no tecido pulmonar e nas vias aéreas.

Palavras-chave: Melatonina; Inflamação; Remodelamento; Asma; DPOC; ACO.

Projeto de iniciação científica financiado pela FAPESP (No. 2020/11716-0).

Trabalho apresentado no XLI Congresso Médico Universitário (COMU) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 14-15 out. 2022. 1º lugar Prêmio Oswaldo Cruz Basic, 1º lugar Prêmio FFM - Fundação Faculdade de Medicina.

1. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. ORCID: Scheffer VC - <https://orcid.org/0000-0003-0670-8002>; Leick EA - <https://orcid.org/0000-0002-1709-8679>; Tibério IFLC - <https://orcid.org/0000-0002-5662-7895>. E-mail: vitorio.scheffer@fm.usp.br, leick51@yahoo.com.br, ioalvo@uol.com.br.

2. Hospital Alemão Oswaldo Cruz. <https://orcid.org/0000-0001-5706-1101>, bemfisio.cristianeribeiro@gmail.com.

3. Hospital Sírio Libanês. <https://orcid.org/0000-0002-7593-2481>, leandro.camargo@outlook.com.br.

Endereço para correspondência: Vitório Crema Scheffer. Rua Oscar Freire, 1436, Apart. 82. São Paulo, SP. CEP: 05409-010. E-mail: contato: vitorio.scheffer@fm.usp.br

ABSTRACT: Background and Objectives: According to previous studies, melatonin, an indolamine, may possibly reduce dyspnea in patients with asthma or COPD. Additionally, it has also been proven, through experimental studies, that the molecule possibly plays an anti-inflammatory role, because it might inhibit transcription of NFκ-B in experimental models of asthma and COPD. This study aims to investigate the effects of melatonin in experimental models of asthma, COPD and Asthma-COPD Overlap (OCP). **Methods:** 64 mice were divided into 8 groups in order to induce COPD (group “ALS”), asthma (“OVA”) or OC (“ACO”). The control group (“SAL”) received saline. The treatment groups (“+MEL”) were submitted to both disease protocols and also received Melatonin (intraperitoneally). After the protocols, the exhaled nitric oxide (Eno) and the total and differential cells of the bronchoalveolar lavage fluid were evaluated. **Results:** OVA+MEL (11.3±1.65ppb) showed reduction in Eno compared to OVA (24.17±4.30ppb). In the analysis of the bronchoalveolar lavage fluid cells, OVA+MEL

(11.3±1.65x10⁴ cells/mL) and ACO+MEL (2.17±0.63x10⁴ cells/mL) showed a reduction in the amount of total cells compared to OVA (25.70±4.59x10⁴ cells/mL) and ACO (14.33±3.11x10⁴ cells/mL), respectively. There was a decrease in eosinophil count in OVA+MEL (5.37±1.41x10⁴ cells/mL) and ACO+MEL (0.87±0.36x10⁴ cells/mL) compared to OVA (18.67±4.01x10⁴ cells/mL) and ACO (1.45±0.41x10⁴ cells/mL), respectively. Additionally, the number of lymphocytes decreased in OVA + MEL (1.00±0.24x10⁴ céls./mL) compared to OVA (3.94±1.15x10⁴ cells/mL). The number of macrophages also decreased in OVA + MEL (3.09±0.39x10⁴ cells/mL) and ACO + MEL (1.10±0.27x10⁴ cells/mL) compared to OVA (7.26±1.93x10⁴ cells/mL) and ACO (6.41±1.54x10⁴ cells/mL), respectively. There was no difference in the comparison of neutrophil counts in the different groups analyzed.

Keywords: Melatonin; Inflammation; Remodeling; Asthma; COPD; ACO.

INTRODUÇÃO

Asma

Asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e pela limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilos, dispneia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e de manhã ao acordar. Resulta de uma interação entre genética, exposição ambiental e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas¹.

A principal característica fisiopatológica da asma é a inflamação brônquica, resultante de um amplo e complexo espectro de interações entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas^{2,3}. A resposta inflamatória alérgica é iniciada pela interação de alérgenos ambientais com células que têm a função de apresentar esses alérgenos ao sistema imunológico, mais especificamente aos linfócitos Th2. Estes, por sua vez, produzem citocinas responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório. A IL-4 desempenha um papel importante no aumento da produção de anticorpos IgE específicos para alérgenos^{1,2,4}.

Vários mediadores inflamatórios são liberados por mastócitos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), por macrófagos (fator de necrose tumoral - TNF-alfa, IL-6, óxido nítrico), por linfócitos T (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5), eosinófilos (principais proteínas básicas, ECP, EPO, mediadores lipídicos e citocinas), neutrófilos (elastase) e células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos, óxido nítrico). Através dessa resposta inflamatória, danos e alterações na integridade epitelial são produzidos. Além disso, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, alterações na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso das vias aéreas estão presentes³. Esses mediadores também

podem atingir o epitélio ciliado, causando danos e ruptura. Como consequência, células epiteliais e miofibroblastos, localizados abaixo do epitélio, proliferam-se e iniciam a deposição intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal, que explica o aparente espessamento desta membrana e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes com asma. Outras alterações, incluindo hipertrofia e hiperplasia muscular lisa, aumento do número de células calciformes, aumento das glândulas submucosas e alteração da deposição e degradação dos componentes da matriz extracelular, Estes são constituintes da remodelação que interfere na arquitetura das vias aéreas, levando à irreversibilidade da obstrução observada em alguns pacientes⁴.

Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

A DPOC é a terceira causa de morte entre as doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, e sua prevalência varia de acordo com a região e a taxa de tabagismo⁵. É uma condição evitável e tratável, caracterizada pela presença de obstrução crônica e persistente do fluxo aéreo. Este processo é geralmente progressivo e está associado à resposta inflamatória anormal dos pulmões e à inalação de partículas e gases tóxicos. Embora a DPOC afete os pulmões, também produz consequências sistêmicas significativas. O processo inflamatório crônico das vias aéreas é uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC. A inflamação crônica causa alterações estruturais e diminuição do lúmen brônquico. A destruição do parênquima pulmonar leva à perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas e diminui a coleta elástica do pulmão. Essas mudanças diminuem a capacidade das vias aéreas de permanecerem abertas durante a expiração^{5,6}.

A inflamação afeta vias aéreas grandes e pequenas, onde encontramos hiperplasia de células calciformes, aumento das glândulas mucosas, infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ nas grandes vias aéreas,

especialmente nos estágios mais avançados da DPOC. O infiltrado inflamatório também é encontrado nas vias aéreas menores, com predominância de macrófagos nos estágios iniciais da doença. (Molet et al., 2005). A destruição do tecido pulmonar resulta do desequilíbrio entre proteinases e antiproteinases. Evidências corroboram a hipótese de que a inalação da fumaça do cigarro induz um aumento no número de neutrófilos e macrófagos, que liberam enzimas como catepsinas B, K, L e S, elastase neutrofílica, proteinase 3, metaloproteinase de matriz (MMP) 9 e 12. Essas enzimas não são totalmente inibidas pelas antiproteinases, levando à destruição do tecido conjuntivo pulmonar⁵.

O remodelamento brônquico é caracterizado pelo aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular nas vias aéreas, o que leva à fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia muscular lisa, bem como hiperplasia das glândulas submucosas, que resulta no espessamento da parede brônquica e do calibre brônquico menor. Tais alterações também são observadas em pacientes com bronquite e em estudos experimentais, sugerindo que o remodelamento brônquico ocorre devido à liberação de vários fatores inflamatórios, crescimento celular e liberação de citocinas⁸. Assim, uma melhor compreensão da fisiopatologia da DPOC e seu tratamento adequado estão entre as estratégias preventivas da doença.

Sobreposição Asma-DPOC (ACO)

A asma e a DPOC já possuem critérios diagnósticos e mecanismos fisiopatológicos amplamente discutidos e definidos. Atualmente, uma variante dessas doenças que possui características de ambas tem sido estudada e denominada sobreposição Asma-DPOC (ACO)^{4,9}. A associação Asma-DPOC é uma doença das vias aéreas caracterizada por obstrução fixa ao fluxo aéreo com características comuns à asma e à DPOC, mas uma definição mais específica não pôde ser estabelecida, devido à falta de evidências científicas sobre o assunto⁴. Sua prevalência é pouco conhecida por carecer de definição clara.

Melatonina

A melatonina foi primeiramente isolada e caracterizada a partir da cavidade bovina pelo dermatologista Aaron Lerner, em 1958¹⁰. É o principal hormônio secretado pela glândula pineal. As fontes secundárias são retina, intestino, pele, plaquetas e medula óssea e provavelmente outras estruturas, mas sua contribuição sistêmica é insignificante¹¹.

A melatonina apresenta alta solubilidade em lipídios e água, o que facilita a passagem através das membranas celulares¹². A melatonina circulante pode atingir todos os tecidos do corpo e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica para modular a atividade cerebral¹³.

Nos últimos anos, a melatonina tem sido usada tanto para efeitos fisiológicos (como controle do ciclo do sono e adaptação sazonal) quanto para suas atividades terapêuticas em metabolismos cardiovasculares e ósseos, funções renais, sistema gastrointestinal e efeitos anticancerígenos.

Estudos indicam que a administração intraperitoneal de melatonina a 10mg/kg inibe significativamente a expressão de NF-κB e regula negativamente a atividade da síntese indutível de NO em tecidos pulmonares e também reduz significativamente a produção de NO em lavagem broncoalveolar em um modelo animal experimental de asma brônquica¹⁴. Os autores concluíram que a melatonina pode diminuir a hiperresponsividade e a inflamação das vias aéreas no modelo ovalbumina de asma brônquica. Os mesmos autores descobriram, em um estudo posterior, que a melatonina inibe significativamente a expressão do fator de crescimento do tecido conjuntivo e reduz a área de muco no modelo de ovalbumina de camundongos asmáticos, com atividade semelhante à exercida pela dexametasona¹⁵.

Além disso, um estudo duplo-cego, randomizado, estudo controlado em adultos asmáticos demonstrou que o suplemento oral de 3mg de melatonina por via oral durante 28 dias melhorou a qualidade subjetiva do sono em pacientes com asma leve ou moderada em comparação com o grupo placebo¹⁶.

Justificativas

Atualmente sabe-se que as doenças pulmonares obstrutivas são um importante problema de saúde e estão entre as principais causas de morte no mundo. Dados epidemiológicos mostram aumento no número de óbitos por DPOC, com aumento de 340% no período de 20 anos⁵. Ressalta-se que as doenças obstrutivas são responsáveis por elevados custos hospitalares, estando associadas a diversas comorbidades e geram importante impacto na vida funcional do indivíduo. Embora tentativas tenham sido feitas para tratar asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, esta área de pesquisa ainda continua sendo um campo que merece muita atenção, especialmente para as condições mais graves.

A melatonina tem a capacidade de mobilizar os mecanismos de enzimas antioxidantes de diferentes tecidos, além de regular o tônus muscular liso e influenciar a resposta imune, sendo altamente eficiente na eliminação de radicais livres, com propriedades antioxidantes. Há pouca evidência sobre a resposta da melatonina na asma e na DPOC e não há evidência em estudos experimentais sobre a síndrome de sobreposição da Asma-DPOC. Assim, a melatonina poderia possivelmente desempenhar um papel no controle dos mecanismos fisiopatológicos das doenças acima mencionadas.

OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo avaliar se a melatonina modula a inflamação pulmonar (avaliada pela contagem de células do líquido de lavagem broncoalveolar) e a quantidade de óxido nítrico exalado em modelos experimentais de asma, DPOC e ACO.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA - FMUSP). 64 camundongos machos BALB/c foram obtidos do viveiro central. Os animais tinham entre 6 e 8 semanas de idade ao sair do viveiro central e foram submetidos a um período de fixação no viveiro de laboratório de 2 semanas.

Os animais foram alimentados *ad libitum* e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controladas de temperatura ambiente (22°C), umidade e ruído, por profissionais treinados, responsáveis pelo cuidado dos animais durante o período de sua permanência no viveiro.

Os cuidados necessários recebidos pelos animais estão de acordo com o “Guia de cuidados e utilização de animais de laboratório” publicado pelos “Institutos Nacionais de Saúde dos EUA” (Publicação NIH n.º 85-23, revista em 1996) e a Lei de Arouca (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008).

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n = 8) de acordo com o protocolo de exposição a que foram submetidos:

Os grupos experimentais foram:

A) SAL (grupo controle - recebeu instilação intraperitoneal e inalações de soro fisiológico NaCl 0,9% (50 µl)) (n=8);

B) OVA (modelo de asma - sensibilizado com ovoalbumina) (n=8);

C) SAL+MEL (grupo controle de tratamento - recebeu instilação intraperitoneal de soro fisiológico e foi tratado com instilação intraperitoneal de melatonina) (n=8);

D) OVA + Melatonin (sensibilizado com ovoalbumina e tratado com instilação intraperitoneal de melatonina) (n=8);

E) ELA (modelo de DPOC - recebeu instilação intratraqueal de elastase pancreática porcina (EPP) (EMD Chemicals, San Diego, CA)) (n=8);

F) ELA + MEL (recebeu instilação intratraqueal de EPP e instilação intraperitoneal de melatonina) (n=8);

G) ACO (modelo de ACO - sensibilizado com ovoalbumina e também instilação intratraqueal de EPP) (n=8);

H) ACO + MEL (sensibilizado com ovoalbumina e EPP intratraqueal, e tratado com instilação intraperitoneal de melatonina). (n=8).

No dia 28 dos protocolos, foram realizadas as

seguintes análises em todos os grupos:

(i) medição do óxido nítrico exalado;

(ii) quantificação do número total de células, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no líquido de lavagem broncoalveolar (FLBA);

Detalhes dos protocolos

Modelo experimental de asma

O protocolo de sensibilização e indução de inflamação pulmonar por ovalbumina durou 28 dias. Os camundongos receberam solução de 50 mg de ovalbumina (Sigma - Aldrich) e 6 mg de hidróxido de alumínio - Alumen (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) por via intraperitoneal (i.p.) nos dias 1 e 14. Nos dias 21, 23, 25 e 27 os animais foram colocados em uma caixa de exposição acrílica acoplada a um nebulizador ultrassônico (US - 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol OVA diluído em NaCl 0,9% na concentração de 10 mg/ml (1%). O tempo de contato dos animais com o aerossol foi de 30 minutos. Ao mesmo tempo, o grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alúmen) (6 mg) por via intraperitoneal (i.p.) e foram expostos 0,9% de aerossol NaCl por 30 minutos¹⁷.

Modelo experimental de DPOC

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano e receberam instilação intratraqueal de elastase pancreática suína (EPP) no dia 21 do protocolo experimental (EMD Chemicals, San Diego, CA) - na dose e concentração de 25 U de PPE/100 g de peso corporal dissolvido em solução salina de 40 µl¹⁸.

Modelo experimental de ACO

Os camundongos deste grupo experimental foram submetidos aos dois protocolos experimentais descritos acima (modelo de asma e lesão pulmonar induzida por elastase), seguindo os protocolos de dose e data^{18,19}.

Modelos experimentais tratados com melatonina

Os camundongos foram tratados intraperitonealmente com Melatonina [15mg/kg (0,45/dia)], do dia 22 ao dia 27²⁰.

Avaliação do óxido nítrico exalado

Durante a ventilação mecânica, o gás foi coletado na porção expiratória do ventilador através de um balão impermeável ao NO (Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, EUA) por 10 minutos. Após o término do período de coleta, os balões foram selados para posterior análise. O óxido nítrico foi então medido por quimioluminescência através de um analisador de resposta rápida (280 NOA - Nitric Oxide Analyzer - Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, EUA). A concentração média de NO_{ex} foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice de concentração de NO no ar exalado.

Avaliação do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)

O FLBA foi produzido por infusão de 0,5 ml de solução salina por três vezes consecutivas (volume total = 1,5ml), por cânula traqueal, com o uso de seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 5°C, por 10 minutos, com recuperação média de 80%. O botão celular foi ressuspenso em 200 µl de solução salina. A contagem total de células foi realizada por microscopia óptica com o hemocitômetro de Neubauer (400x). Para contagem diferencial, 100 µl do LBA será citocentrifugado a 450 rpm por 6 minutos e após a secagem a lâmina foi corada pela técnica Diff-Quick. A contagem diferencial de células foi determinada a partir de 300 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios citológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com auxílio de microscópio óptico com objetivo de imersão (1000X)²¹.

Descarte de carcaças

As carcaças dos animais foram colocadas em sacos de lixo brancos, identificados com etiquetas padrão e armazenados em geladeira. As sacolas foram então realizadas por funcionários da empresa de limpeza técnica do hospital e os resíduos transportados para o abrigo de resíduos, para coleta diária noturna para tratamento e disposição final, após a emissão (pelo veterinário responsável) do relatório e do documento de acompanhamento.

RESULTADOS

Todos os dados dos grupos realizados foram analisados utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA). Os dados paramétricos foram apresentados como média ± erro padrão (SE), e foram comparados utilizando o teste de Holm-Sidak, sendo apresentados na forma de barras. Todas as análises foram realizadas usando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, SPSS Inc., EUA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os resultados obtidos em todos os parâmetros do grupo SAL-MEL, quando comparados com o grupo SAL (controle), não apresentaram diferença. Além disso, a comparação entre SAL-MEL e outros grupos apresentou os mesmos resultados que a comparação entre SAL e demais grupos. Portanto, os resultados de SAL e SAL-MEL foram agrupados e apresentados como um (SAL) na análise a seguir.

Células totais do fluido do lavado broncoalveolar (FBAL)

A Figura 1 demonstra a contagem de células totais presentes no fluido do lavado broncoalveolar (10^4 células/mL) nos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL,

ACO e ACO-MEL. Houve aumento da contagem de células totais de OVA, OVA-MEL e ACO em comparação ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Houve diminuição na contagem de células totais no grupo OVA-MEL em comparação ao grupo OVA-MEL ($p < 0,05$). Houve diminuição na contagem de células totais do grupo ACO-MEL em comparação ao grupo ACO e em comparação ao grupo OVA-MEL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Não houve diferença entre os grupos SAL, ACO-MEL, ELA e ELA-MEL.

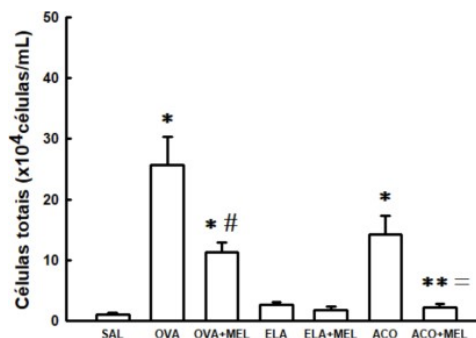


Figura 1: Gráfico da contagem total de células dos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL; * $p < 0,05$ para OVA, OVA-MEL e ACO, em comparação com o grupo SAL; # $p < 0,05$ para OVA-MEL, em comparação com o grupo OVA; ** $p < 0,05$ para ACO-MEL, em comparação com ACO; = $p < 0,05$ para ACO-MEL, em comparação a OVA-MEL

Análise das células diferenciais do fluido do lavado broncoalveolar

Eosinófilos

A Figura 2 mostra a contagem de eosinófilos presentes no líquido de lavagem broncoalveolar (10^4 células/mL) nos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL. Houve aumento na contagem de eosinófilos nos grupos OVA, OVA-MEL e ACO em relação ao grupo SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Houve diminuição da contagem de eosinófilos no grupo OVA-MEL em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve redução na contagem de eosinófilos no grupo ACO-MEL em relação ao grupo ACO ($p < 0,05$). A contagem de eosinófilos não apresentou diferença entre os grupos SAL, ACO-MEL, ELA e ELA-MEL.

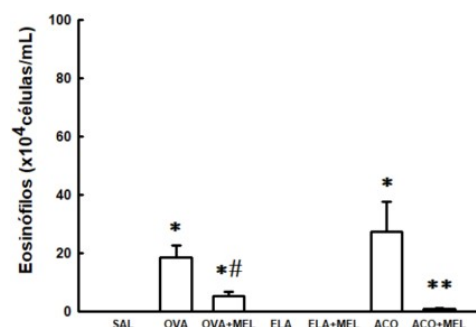


Figura 2: Gráfico da contagem de eosinófilos dos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO; * $p < 0,05$ para OVA, OVA-MEL e ACO, em comparação com o grupo SAL; # $p < 0,05$ para OVA-MEL, em comparação com o grupo OVA; ** $p < 0,05$ para ACO-MEL, em comparação ao grupo ACO

Linfócitos

A Figura 3 mostra a contagem de linfócitos presentes no líquido de lavagem broncoalveolar (10^4 células/mL) nos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL. Houve aumento da contagem de linfócitos no grupo OVA em relação ao grupo SAL ($p < 0,05$). Houve redução na contagem de linfócitos no grupo OVA-MEL em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença no número de linfócitos entre os grupos SAL, ELA, ELA-MEL e ACO e ACO-MEL.

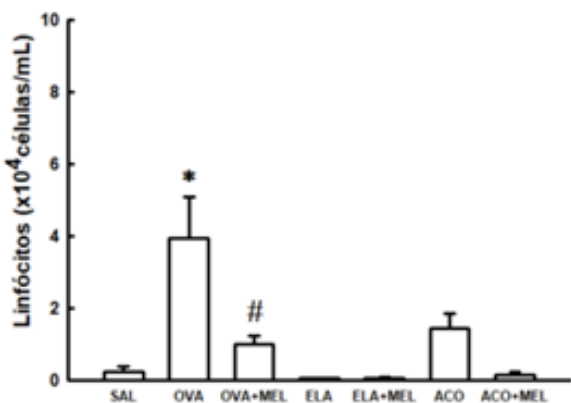


Figura 3: Gráfico da contagem de linfócitos dos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL; * $p < 0,05$ para OVA em comparação com o grupo SAL; # $p < 0,05$ para OVA-MEL em comparação com o grupo OVA

Macrófagos

A Figura 4 demonstra a contagem de macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar (10^4 células/mL) nos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL. Há aumento na contagem nos grupos OVA e ACO em comparação ao grupo SAL ($p < 0,05$). Houve redução na contagem no grupo ACO-MEL em relação a ACO ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL e ACO-MEL. Não houve diferença entre os grupos OVA e OVA-MEL.

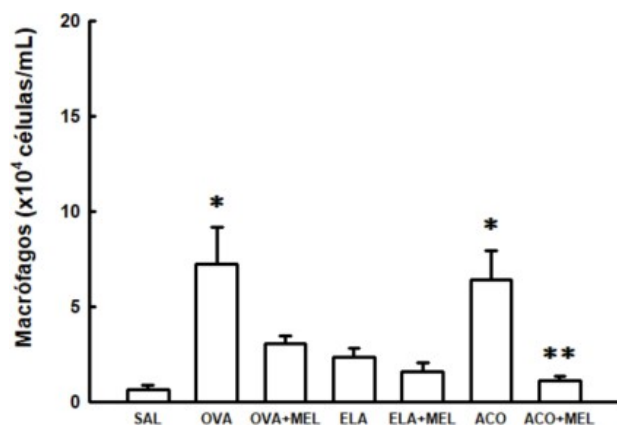


Figura 4: Gráfico da contagem de macrófagos dos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL; * $p < 0,05$ para OVA e ACO, em comparação ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ para ACO-MEL, em comparação ao grupo ACO

Neutrófilos

A Figura 5 demonstra a contagem de neutrófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar (10^4 células/mL) nos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL. Não houve diferença entre os grupos analisados.

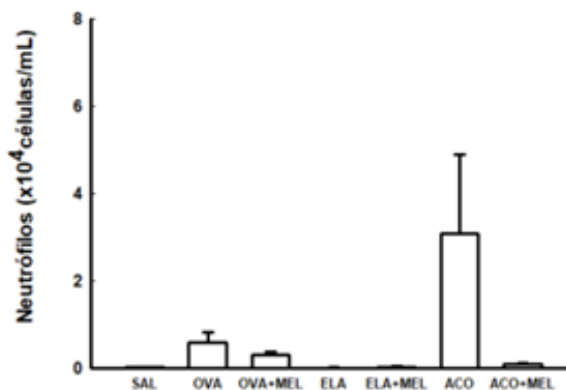


Figura 5: Gráfico da contagem de neutrófilos dos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL; não houve diferença entre os grupos analisados

Avaliação do óxido nítrico exalado

A Figura 6 demonstra a quantificação do óxido nítrico exalado (NO, como ppb) nos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL. Houve aumento na quantidade no grupo OVA, comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$). Houve diminuição da quantidade no grupo OVA-MEL em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença na quantidade de NO exalado entre os grupos SAL, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO e ACO-MEL.

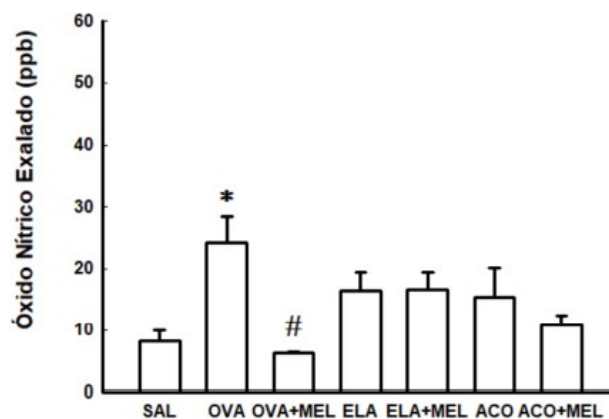


Figura 6: Gráfico da quantificação do óxido nítrico exalado dos grupos SAL, OVA, OVA-MEL, ELA, ELA-MEL, ACO, ACO; * $p < 0,05$ para OVA, quando comparado com o grupo SAL; # $p < 0,05$ para OVA-MEL, quando comparado com o grupo OVA

DISCUSSÃO

Resposta inflamatória observada no FLBA

Observamos que os animais do modelo experimental de asma utilizando ovalbumina apresentaram

aumento no número de células totais, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, conforme esperado na fisiopatologia desta doença. O tratamento com melatonina reduziu o número total de células, eosinófilos e linfócitos neste modelo experimental de asma.

No modelo de lesão pulmonar induzida pela elastase (ELA e ELA-MEL) não houve alterações significativas nas células de lavagem broncoalveolar.

Ao avaliar os animais do modelo ACO, observamos que houve aumento no número de células totais, macrófagos e eosinófilos. Também observamos que a resposta observada nos animais ACO foi semelhante à observada no modelo experimental de asma, com exceção da resposta linfocitária. Para melhor compreender estes dados será necessário avaliar o perfil de resposta dos linfócitos (Th1, Th2 e Th17). Notamos que o tratamento com melatonina reduziu o número total de células, macrófagos e eosinófilos, reforçando a relação entre a fisiopatologia da asma e a ACO.

Como discutido no modelo ACO, houve um aumento de células totais representadas por macrófagos, eosinófilos e linfócitos, bem como o observado no modelo experimental de asma, demonstrando mais uma vez a relação entre ACO e asma.

Óxido nítrico exalado

Animais do modelo experimental de asma utilizando ovoalbumina apresentaram aumento no NO exalado e o tratamento com melatonina reduziu esse parâmetro. Este resultado corrobora os achados de resposta inflamatória observados nesses animais no líquido de lavagem broncoalveolar.

No modelo de lesão pulmonar induzida pela elastase (ELA e ELA-MEL) não houve alterações no NO exalado. Além disso, não houve diferença entre os grupos ACO e ACO+MEL, não houve diferença no NO exalado.

O NO é sintetizado endogenamente por uma das três isoformas do NOS, com diferentes atividades, duas constitutivas (Enos, derivadas do endotélio; e Nnos, derivadas de neurônios) e uma induzida (Inos)^{22,23}. Isoformas constitutivas estão envolvidas na vasodilatação e broncodilatação. O Inos é estimulado por muitas citocinas pró-inflamatórias e é expresso em alguns tipos de células inflamatórias^{24,25}. O NO derivado da enzima Nnos tem um efeito benéfico na asma, causando relaxamento nos

músculos lisos brônquicos, estando presente nos nervos do sistema NANC. No entanto, o NO derivado da enzima Enos pode levar à vasodilatação nas arteríolas, com consequente extravasamento plasmático e edema. A grande quantidade de NO da enzima Inos pode resultar em vasodilatação, extravasamento plasmático, aumento da secreção de muco e ativação indireta de células Th1/Th2 contribuindo para os sinais e sintomas da doença⁴. Uma redução na produção de NO, observada no grupo OVA-MEL, em comparação com OVA, pode levar a uma redução na secreção de muco e também na desativação de células Th1/Th2.

Além disso, a reação do NO com radicais livres como o oxigênio produz compostos reativos nitrogenados que exercem funções fisiológicas e são importantes para a destruição de microrganismos^{23,25}. No entanto, as células inflamatórias dos asmáticos têm maior capacidade de gerar radicais livres quando comparadas aos controles, que posteriormente contribuem para altas concentrações de compostos reativos ao nitrogênio, o que pode causar efeitos deletérios²⁶. Quando as vias aéreas são expostas ao estresse oxidativo, o peroxinitrito (ONOO-), um dos potentes oxidantes formados pela reação entre NO e oxigênio, é responsável por várias alterações, vale ressaltar o dano ao DNA, estimulação da degradação dos lipídios, proteínas e carboidratos, que podem alterar as funções celulares e potencializar as respostas inflamatórias²⁶. De acordo com um estudo prévio, a melatonina possivelmente possui efeito antioxidante, como também observado na redução de eNO no grupo OVA+MEL²⁷. O controle da expressão de NO pode desempenhar um papel significativo na redução do estresse oxidativo nas vias aéreas e no parênquima pulmonar.

CONCLUSÃO

A melatonina desempenha possível papel anti-inflamatório e de controle de hiperresponsividade brônquica em modelos experimentais de asma e ACO, atenuando principalmente a resposta inflamatória de componente eosinofílico. A melatonina apresentou-se indiferente no controle inflamatório de modelos experimentais de lesão pulmonar induzida por elastase. Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos exatos de ação da molécula em vias aéreas e parênquima pulmonar.

Participação dos autores: *Vitório Crema Scheffer* - responsável por revisão de literatura, execução de protocolos experimentais, realização de mecânica pulmonar, leitura de lâminas, análise estatística e redação de artigo; *Cristiane de Cássia Ribeiro* - responsável por revisão de literatura, execução de protocolos experimentais, realização de mecânica pulmonar, leitura de lâminas, análise estatística e redação de artigo; *Leandro Camargo* - responsável por realização de mecânica pulmonar leitura de lâminas, análise estatística, e redação de artigo; *Edna Aparecida Leic* - responsável por revisão de literatura e análise estatística; *Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério* - responsável por revisão de literatura e análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344(5):350-62. doi: 10.1056/NEJM200102013440507

2. Upparahalli Venkateshaiah S, Manohar M, Kandikattu HK, Mishra A. Experimental Modeling of Eosinophil-Associated Diseases. *Methods Mol Biol*. 2021;2241:275-291. doi: 10.1007/978-1-0716-1095-4_21

3. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May;161(5):1720-45. doi: 10.1164/ajrcem.161.5.9903102
4. GINA. The Global Initiative for Asthma [cited 2021]. Available from: <http://www.ginasthma.org>.
5. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. 2017. GOLD 2017 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. Available from: <http://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosis-management-prevention-co-pd/>
6. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672-88. doi: 10.1183/09031936.03.00040703
7. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Pagé N, Olivenstein R, Elias J, Chakir J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(3):430-8. doi: 10.1067/mai.2001.117929
8. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):451-62; quiz 463-4. doi: 10.1016/j.jaci.2011.04.047
9. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J.* 2007;30(5):993-1013. doi: 10.1183/09031936.00082507. PMID: 17978157
10. Lerner A, Case J, Mori W, et al. Melatonin in peripheral nerve. *Nature.* 1959;183:1821. <https://doi.org/10.1038/1831821a0>.
11. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(2):152-66. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.004
12. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem.* 1980;34(6):1761-3. doi: 10.1111/j.1471-4159.1980.tb11272.x
13. Le Bars D, Thivolle P, Vitte PA, Bojkowski C, Chazot G, Arendt J, Frackowiak RS, Claustrat B. PET and plasma pharmacokinetic studies after bolus intravenous administration of [¹¹C] melatonin in humans. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1991;18(3):357-62. doi: 10.1016/0883-2897(91)90132-5
14. Wang Y, Chen S, Xu S. Effect of melatonin on the expression of nuclear factor-kappa B and airway inflammation in asthmatic rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2004;42(2):94-7.
15. Wang M, Li B, Zhang GH. Melatonin decreases the expression of connective tissue growth factor and inhibits airway remodeling in asthmatic mouse. *Basic Clin Med.* 2010;3:012.
16. Campos FL. Estudos do efeito da melatonina sobre a função pulmonar e a qualidade do sono na asma [dissertação]. Fortaleza: Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará; 2004.
17. Aristóteles LRCRB. Anti-IL17 na modulação da mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbada pelo LPS [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; 2018 [citado 18 nov. 2022]. doi:10.11606/T.5.2018.tde-31102018-101055
18. Ikeda G, Miyahara N, Koga H, Fuchimoto Y, Waseda K, Kurimoto E, Taniguchi A, Tanimoto Y, Kataoka M, Tanimoto M, Kanehiro A. Effect of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on experimental emphysema and asthma combined with emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(1):18-29. doi: 10.1165/rcmb.2012-0418OC
19. Toledo AC, Sakoda CP, Perini A, Pinheiro NM, Magalhães RM, Grecco S, Tibério IF, Câmara NO, Martins MA, Lago JH, Prado CM. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Br J Pharmacol.* 2013;168(7):1736-49. doi: 10.1111/bph.12062
20. Shin N-R, Ko J-W, Kim J-C, et al. Role of melatonin as an SIRT1 enhancer in chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. *J Cell Mol Med.* 2020;24:1151-1156. doi: 10.1111/jcmm.14816
21. Martins-Oliveira BT, Almeida-Reis R, Theodoro-Júnior OA, Oliva LV, Neto dos Santos Nunes N, Olivo CR, Vilela de Brito M, Prado CM, Leick EA, Martins MA, Oliva ML, Righetti RF, Tibério IF. The plant-derived Bauhinia bauhinioides Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) attenuates elastase-induced emphysema in mice. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:5346574. doi: 10.1155/2016/5346574
22. Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S95-102. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.047
23. Rodway GWJ, Choi, Sethi, Hoffman LA, JM. Exhaled nitric oxide in the clinical management of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009;4(6):454-459. doi: 10.1007/s11882-004-0011-7
24. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IF. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Apr;288(4):L741-8. doi: 10.1152/ajplung.00208.2004
25. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev.* 2004 Jul;84(3):731-65. doi: 10.1152/physrev.00034.2003
26. Zuo L, Koozechian MS, Chen LL. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014 Jan;112(1):18-22. doi: 10.1016/j.ana.2013.10.007
27. Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, Selamoglu Z, Gulhan MF, Nabavi SM. Melatonin and Respiratory Diseases: A Review. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(4):467-488. doi: 10.2174/1568026616666160824120338

Recebido: 18.11.2022
 Aceito: 20.11.2022