VIVIANE CHRISTINA RUIZ

**Papel da indução de tolerância oral no
remodelamento de vias aéreas e na expressão da
óxido nítrico sintase neuronal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de Fátima
Lopes Calvo Tibério

**SÃO PAULO
2006**

*Dedico esse trabalho à minha família,
onde encontro o meu remanso,
onde dar é tão possível quanto receber,
onde posso chorar e rir com loucura,
onde posso recarregar as energias e
tirar exemplos de coragem e força*

Dedicatória

Aos meus pais, **Antonio e Brasilina**,

Pelo modelo de luta, solidez moral e firmeza de caráter, por ter me proporcionado apoio incondicional em todas as decisões em minha vida.

É difícil a distância... é difícil pensar que já se passaram quase treze anos longe de vocês e que papai tem agora quase todos os cabelos brancos.

Sei que as minhas idas para casa estão cada vez mais difíceis e que deixamos de compartilhar momentos de alegria por eu estar a maior parte do tempo envolvida com o trabalho e com minha formação profissional. Renunciar a esses momentos não está sendo tarefa fácil, mas estou seguindo o meu caminho que vocês, com todo amor, me ajudaram a construir.

Vocês souberam me transmitir, não apenas com palavras, mas com exemplos, que é possível transpor obstáculos, dominar os medos, desafiar os limites, construir sonhos e concretizá-los no amor.

Obrigada por encherem minha vida com tanto amor e carinho e agradeço também às incansáveis orações de mamãe que sempre

deram certo. Amo muito vocês. Minha amizade, meu amor, minha admiração e respeito sempre...

Ao Fábio,

Pessoa maravilhosa e encantadora que admiro cada dia mais. Obrigada por estar sempre disposto a ouvir, a estar sempre presente me dando carinho, apoio e motivação. Você é encantador e faço minhas as palavras de Carlos Drummond de Andrade: "Se o primeiro e o último pensamento do seu dia for essa pessoa, se a vontade de ficar juntos chegar a apertar o coração, agradeça: algo do céu te mandou um presente divino: O AMOR". Você é meu presente. Eu te amo muito.

Aos meus queridos irmãos Eduardo e Luciana,

Sem o amor de vocês eu não teria conseguido. Sei o quanto vocês torceram para que tudo acabasse bem e por isso são parte desta conquista. Sou imensamente grata a Deus, porque, além de lindos e maravilhosos, vocês são os melhores irmãos do mundo. Amo muito vocês.

À Lara,

Minha cunhada e amiga, na verdade quase irmã. Seus gestos de carinho e amizade tornaram minha caminhada mais suave e foram fundamentais, principalmente nos momentos que as dificuldades me fizeram esmorecer.

À minha tia Cecília,

Pessoa meiga e prestativa, que com toda ternura me acolheu como filha. Foi um grande privilégio contar com sua ajuda, com seu carinho, sua "comidinha" e seu colo.

Aos meus primos Ricardo, Keila e Cristiano,

Que me ensinam, cada um a sua maneira, que as dificuldades jamais devem tomar uma dimensão maior que nossos ideais. Admiro a força de vocês e agradeço toda ajuda.

A Eduardão e Cida, Marcão e Rogéria, primos e a todas as outras pessoas que compõem a minha família e acompanharam minha trajetória torcendo, motivando e ajudando-me no que fosse possível.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a **Deus**,

Que antes mesmo que eu fosse formada no ventre de minha mãe, escolheu-me para um propósito especial. Que me deu a felicidade de ter uma família maravilhosa e colocado-me sempre no lugar certo, na hora certa e sempre guiada por pessoas boas e iluminadas em todos os momentos de minha vida.

Minha gratidão imensa à **Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério**,

Minha orientadora, mulher incrivelmente talentosa, modelo de dedicação ao trabalho, pela oportunidade de fazer pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, carinho e pela confiança em mim depositada.

Expresso a minha admiração pelas suas grandes idéias e ideais, amor ao trabalho e à pesquisa. Uma grande mulher!!!.

Você é parte da minha história e a terei sempre como exemplo em minha vida. Com todo meu coração meu eterno agradecimento e minha profunda admiração.

Ao Prof. Milton de Arruda Martins,

Exemplo a ser seguido como ser humano e como profissional. Nada menos do que possuidor de um brilhantismo, liderança nata e serenidade inabalável. São indescritíveis a minha felicidade e a minha gratidão pela oportunidade de usufruir seus conhecimentos e admirar sua astúcia, inteligência, competência e acima de tudo seu lado humano.

À minha companheira de projeto e amiga Tatiana Drewiacki,

Que me ajudou imensamente neste trabalho, mostrando-se sempre interessada, alegre e prestativa. Obrigada pela disponibilidade e pelos conhecimentos divididos. Agradeço MUITÍSSIMO sua amizade, seu incentivo constante, suas palavras de apoio nos momentos de incertezas e, sobretudo, sua alegria. Você com sua energia e sua idéias geniais foi fundamental para a realização deste sonho. Essa tese não é só minha, é NOSSA. Adoro e admiro muito você. Estamos sentindo muito a sua falta!

Ao Prof. Fábio Fernandes Morato Castro,

Meu anjo protetor, se assim me permitir. Modelo de professor e pesquisador e pessoa admirável pela docilidade de atitudes. Foi um privilégio, ou melhor, muito mais que isso, foi uma

bênção divina, contar com seu apoio e sua torcida para que este trabalho se concretizasse como tese de doutorado. Fica aqui expresso que sou sua fã e o admiro pela sua generosidade, dedicação ao ensino, à pesquisa e ao doente. Meu profundo e sincero agradecimento pelo incentivo e ajuda.

Aos colegas Edna, Carla e David,

Pela orientação e auxílio nos experimentos. Deixo aqui registrado o meu muito obrigada.

À Dra. Adenir Perini,

Pela gentileza e auxílio na realização e ensinamentos sobre os estudos de anafilaxia cutânea passiva.

À Beatriz M. Saraiva Romanholo,

Pela prestabilidade e auxílio na leitura do óxido nítrico. Agradeço a paciência, a amizade e sua torcida.

À Profa. Vera Capelozzi,

Pelas sugestões sobre remodelamento das vias aéreas no modelo de tolerância.

À Fernanda Magalhães Arantes-Costa,

Pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda na execução dos animais submetidos à curva dose-resposta à metacolina. Foi um privilégio tê-la de prontidão nesta fase de grandes dificuldades.

Á Flávia Tayar Fernandes,

Agradeço por ter-me introduzido no laboratório e por ter me orientado e ensinado nas fases iniciais deste estudo.

À Adriane Sayuri Nakashima,

Amiga de coração e cumplicidade. Obrigada pela sua amabilidade e ajuda na fase de concretização desse estudo e mais especialmente pelo carinho e apoio em situações difíceis e importantes em minha vida. Adoro você. Valeu T2!

À Esmeralda e à Sandra,

Que sempre, com grande docilidade, ajudaram-me generosamente no preparo das lâminas.

À Ana e ao Reginaldo,

Pela ajuda no manuseio do analisador de imagens.

À Rosana,

Secretária deste laboratório, pessoa admirável em competência, força e grandeza espiritual. Admiro muito você!

À Sirlene,

Sempre contagiando o ambiente com seu sorriso e entusiasmo. Obrigada pelos abraços das horas de alegria e das horas difíceis, por ter enxugado as minhas lágrimas de desespero e de felicidade. Agradeço ainda, por ter segurado a minha mão em momentos que pensei que fosse desfalecer e por me lembrar da simples palavra: você pode. Jamais esquecerei sua alegria e sua torcida. Adoro você!

Às colegas de pós-graduação **Patrícia, Fabiana e Rafael** pela convivência agradável e pelo companheirismo.

Ao David e ao Carlos,

Pelos seus valorosos trabalhos no biotério, cuidando de nossas pequeninas cobaias e também pela prontidão, pela disponibilidade, ajuda nos experimentos e enlace de amizade e carinho.

A Tatiana Lanças, Tatiana Pinto, Fernanda Lopes, Francine, Alessandra, Sandra, Prof. Paulo Saldiva e colegas do laboratório LIM 05 e LIM 61,

Pelo prazer da convivência, sugestões e palpites.

Aos amigos Joaquim Pereira Romão, Domingos Maria Goulart e Ademar G. da Costa,

Anjos de luz, pessoas maravilhosas que cruzaram o meu caminho e marcaram para sempre a minha vida. Conhecer vocês significou o marco de uma história que a partir de então se reiniciou, e de maneira muito mais fortalecida.

Aos amigos Luciana, Paulo, Durval, Kiko, Élton, irmão Luciano e outros amigos penelistas,

Agradeço o calor humano, o afeto e a acolhida de vocês em momentos que foram decisivos em minha vida. Com vocês criei o vínculo do amor e da amizade e o compromisso de aprender e reaprender, dia a dia, o sentido de viver.

Agradecimento muito especial e de todo coração ao **Sr. Romeu e à Maria Teresa,**

Pessoas de garra e grandezas ímpares, que ensinam com exemplos de vida que a dedicação, a paciência, o amor ao ensino e a pesquisa e sobretudo a confiança em Deus são os ingredientes para o desenvolvimento pessoal e profissional.

A **Cristina e Paulo, Romeu e Patrícia** e meus mais novos amigos, **Maria Paula, Edward e Joece,**

Pela receptividade, alegria e torcida sob todos os aspectos, especialmente no amor.

À **Ana Lúcia,** pelo auxílio nas solicitações das folgas que foram essenciais para a realização dos experimentos e participação das aulas na pós-graduação. Agradeço também a **Claudia** pelo apoio e credibilidade.

Às minhas **colegas de convívio diário no Hospital,**

Que acompanharam passo a passo a realização deste sonho de fazer pós-graduação e que dividem comigo o prazer de reabilitar.

Aos meus pacientes,

Pela marcante influência que despertaram em minha vida, por me ensinar que pequenos gestos podem alterar a natureza das coisas, que aprender primeiramente a ouvir pode solucionar algum problema, que meu entusiasmo pode edificar alguém e que meus conhecimentos aplicados a vocês acabam vertendo em minha própria satisfação e felicidade. Agradeço principalmente aos pacientes asmáticos que foram a razão deste estudo.

Meu respeito e agradecimento às nossas pequeninas grandes **cobaías**, que, embora pequenas e frágeis, são possuidoras da grandeza de servir a humanidade.

A todos que, de algum modo, fizeram ou fazem parte da minha vida ou de meu convívio e que contribuíram ou torceram pela realização deste trabalho.

Obrigada Senhor, sempre...

*“A maior missão do homem
é dar a luz a si mesmo e
tornar-se aquilo que ele é
potencialmente”.*

(Erick Fromm)

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptadas de *International committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Quadros e Tabela

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Asma brônquica.....	2
1.2. Remodelamento brônquico.....	28
1.3. Hiper-responsividade brônquica.....	44
1.4. Óxido nítrico.....	47
1.5. Tolerância imunológica.....	56
2. OBJETIVOS.....	79
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
3.1 Animais.....	83
3.2 Protocolo de sensibilização.....	84
3.3 Método de indução de tolerância.....	85
3.4 Determinação dos grupos experimentais.....	86
3.5 Determinação das concentrações de óxido nítrico exalado.....	89
3.6 Protocolo de avaliação da mecânica pulmonar.....	90
3.7 Protocolo de avaliação da curva dose-resposta à metacolina.....	93
3.8 Análise morfométrica.....	95
3.9 Estudo histopatológico.....	96

3.10	Estudo histoquímico com o método cianeto-resistente para peroxidase de eosinófilos.....	97
3.11	Análise dos eosinófilos na medula óssea.....	99
3.12	Anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	99
3.13	Imunoistoquímica para a detecção de nNOS no epitélio brônquico.....	101
3.14	Estudo do conteúdo de fibras colágenas e elásticas na parede das vias aéreas.....	104
3.15	Análise estatística.....	109
3.16	Reagentes.....	110
4.	RESULTADOS.....	112
	PARTE A: Modulação por diferentes modelos de indução de tolerância oral em cobaias: avaliação da hiper-responsividade brônquica, do óxido nítrico exalado, da inflamação pulmonar crônica, da produção de anticorpos anafiláticos e da eosinofiloiose	113
	PARTE B: Papel da indução de tolerância oral no remodelamento das vias aéreas e na expressão da óxido nítrico sintase neuronal.....	141
5.	DISCUSSÃO.....	154
6.	CONCLUSÕES.....	182
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185

LISTA DE ABREVIATURAS

a Treg	Células T reguladoras adaptativas
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
CD	Classe de diferenciação ou marcador de membrana (“cluster of differentiation”)
CisLTs	Leucotrienos cisteínicos (C ₄ , D ₄ e E ₄)
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito citotóxico
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ED ₅₀ Ers	Dose de metacolina responsável por 50% da resposta máxima da elastância do sistema respiratório
ED ₅₀ Rrs	Dose de metacolina responsável por 50% da resposta máxima da resistência do sistema respiratório
EGF	Fator de crescimento da epiderme
e-NANC	Componente excitatório do NANC
NO _{ex}	Óxido nítrico exalado
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Proteína neurotóxica de eosinófilos
EPO+	Peroxidase eosinofílica positiva
Ers	Elastância do sistema respiratório
<i>et al.</i>	e outros
FGF	Fator de crescimento do fibroblasto
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino delgado
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
Grupo OVA	Animais que receberam inalações com ovoalbumina e água <i>ad libitum</i>
Grupo SAL	Animais que receberam inalações com soro fisiológico e água <i>ad libitum</i>
Grupo TO1	Animais que receberam solução de ovoalbumina oral a 2% <i>ad libitum</i> a partir da primeira inalação com ovoalbumina
Grupo TO2	Animais que receberam solução de ovoalbumina oral a 2% <i>ad libitum</i> a partir da quarta inalação com ovoalbumina
HE	Hemotolixina e eosina

HSA	Albumina do soro humano
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IE	Índice de edema peribrônquico
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento tipo insulina
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
i-NANC	Componente inibitório do NANC
i.p.	Intraperitoneal
LFA ₁	Antígeno associado a leucócitos
LMN	Linfomononuclear
L-NAME	L-NG-nitroarginina metil ester
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MBP	Proteína básica principal
MMP	Metaloproteinase
MN	Mononucleares
MHC	Complexo de histocompatibilidade
NANC	Sistema não-adrenérgico não-colinérgico
NKA	Neurocinina A
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
nP	Número de pontos
n Treg	Células T reguladoras naturais
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator ativador plaquetário
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PG	Prostaglandina
PEEP	Pressão positiva expiratória final
PFE	Pico de fluxo expiratório

PMN	Polimorfonucleares
ppb	Partes por bilhão
Ptr	Pressão traqueal
rpm	Rotação por minuto
Rrs	Resistência do sistema respiratório
s.c.	Subcutânea
SCF	Fator célula-tronco
SP	Substância P
t	tempo
tg	Transgênica
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator transformador do crescimento beta
T $\gamma\delta$	Linfócito T gama-delta
Th	Linfócito T auxiliar (“helper”)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
Tr1	Células T reguladoras Tipo 1
Th3	Células T reguladoras Tipo 3
TUNEL	Marcador do entalhe do terminal dUTP
V	Volume
V'	Fluxo
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Δ max Ers	Variação máxima de Ers
Δ max Rrs	Variação máxima de Rrs

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais fatores de risco para asma.....	9
Quadro 2 - Sinais clínicos e funcionais de gravidade da asma.....	12
Tabela 1 – Média e erro padrão dos parâmetros avaliados nas vias aéreas em cada um dos grupos experimentais.....	151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo das células do músculo liso das vias aéreas e seus principais mediadores.....	33
Figura 2 - Representação esquemática das fibras do sistema elástico.....	36
Figura 3 - Esquema representativo da mucosa do trato intestinal e de seus componentes celulares.....	59
Figura 4 - Esquema representativo dos diferentes mecanismos de tolerância oral.....	62
Figura 5 - Esquema do protocolo de sensibilização e determinação dos dois grupos de tolerância.....	87
Figura 6 – Esquema de determinação dos grupos experimentais.....	88
Figura 7 - Arranjo experimental para avaliação da mecânica pulmonar e da curva dose-resposta à metacolina.....	94
Figura 8 - Representação esquemática do retículo sobreposto à ocular do microscópio.....	98
Figura 9 - Imunoistoquímica para nNOS e delimitação do epitélio das vias aéreas.....	103
Figura 10 - Fotomicrografias de vias aéreas exemplificando as medidas realizadas por meio da análise de imagem para avaliar o conteúdo de fibras elásticas e de colágeno na parede da via aérea.....	108
Figura 11 - Tempo de inalação.....	115
Figura 12 - Valores basais do óxido nítrico exalado.....	116
Figura 13 - Valores da porcentagem de aumento da resistência do sistema respiratório (Rrs).....	118

Figura 14 - Valores da porcentagem de aumento da elastância do sistema respiratório (Ers).....	119
Figura 15 - Curva dose-resposta à metacolina mostrando os valores de Rrs e Ers.....	122
Figura 16 - Valores máximos da Rrs na curva dose-resposta à metacolina...	123
Figura 17 - Dose de metacolina responsável para que se atinja resposta de Rrs equivalente a 50% do valor da resposta máxima.....	124
Figura 18 - Valores máximos da Ers na curva dose-resposta à metacolina.....	125
Figura 19 - Dose de metacolina responsável para que se atinja resposta de Ers equivalente a 50% do valor da resposta máxima.....	126
Figura 20 - Valores do índice de edema peribrônquico.....	128
Figura 21 - Valores do número de células polimorfonucleares.....	130
Figura 22 - Valores do número de células mononucleares.....	131
Figura 23 - Fotomicrografias de vias aéreas coradas com HE.....	133
Figura 24 - Valores da contagem de células EPO+ na parede das vias aéreas.....	135
Figura 25 - Fotomicrografias das vias aéreas não-cartilaginosas submetidas à coloração histoquímica para peroxidase eosinofílica cianeto resistente.....	136
Figura 26 - Valores de eosinófilos na medula óssea.....	138
Figura 27 - Fotomicrografias da medula óssea coradas com HE.....	139
Figura 28 - Valores de contagem de células epiteliais brônquicas nNOS positivas das vias aéreas não-cartilaginosas.....	143
Figura 29 - Fotomicrografia das vias aéreas não-cartilaginosas submetidos à coloração imunoistoquímica para a detecção de nNOS.....	144
Figura 30 - Fotomicrografias de cortes histológicos corado com picro-sírius e polarizados e os respectivos <i>thresholds</i>	146
Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados com resorcina-fucsina e os respectivos <i>thresholds</i>	148
Figura 32 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados com resorcina-fucsina com oxidação prévia e os respectivos <i>thresholds</i>	149
Figura 33 - Porcentagem de área das vias aéreas ocupada pelas fibras colágenas e elásticas	153

RESUMO

Ruiz VC. Papel da indução de tolerância oral no remodelamento de vias aéreas e na expressão da óxido nítrico sintase neuronal [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

INTRODUÇÃO: A indução de tolerância oral atenua a resposta inflamatória e a produção de anticorpos anafiláticos secundários presentes em quadros alérgicos pulmonares tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Nestas situações, a modulação do remodelamento brônquico e o papel do óxido nítrico não foram previamente estudados. **OBJETIVOS:** **1.** Desenvolver dois modelos de tolerância oral em cobaias com inflamação crônica pulmonar caracterizando: mecânica pulmonar, hiper-responsividade a metacolina, óxido nítrico exalado (NO_{ex}), anticorpos IgG_1 , inflamação brônquica e eosinofiloipoiese. **2.** Avaliar o remodelamento brônquico e a expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no epitélio brônquico nestes animais. **MÉTODOS:** As cobaias receberam inalações de ovoalbumina ou soro fisiológico durante 15 minutos ou até que apresentassem desconforto respiratório (este tempo foi denominado tempo de inalação). O protocolo foi repetido duas vezes por semana durante quatro semanas. Para a indução da tolerância foi administrada ovoalbumina a 2% por via oral e oferecida *ad libitum*, sendo formados os grupos: 1. TO1 (recebeu ovoalbumina oral a 2% a partir da primeira inalação com ovoalbumina); 2. TO2 (recebeu ovoalbumina oral a 2% a partir da quarta inalação com ovoalbumina); 3. SAL (recebeu água *ad libitum* e inalações com soro fisiológico); 4. OVA (recebeu água *ad libitum* e inalações com solução de ovoalbumina). Após os animais serem anestesiados e ventilados, foram avaliados: 1. mecânica pulmonar basal e

após inalação com ovoalbumina (30mg/ml) ou soro fisiológico, 2. hiper-responsividade brônquica à metacolina, 3. coletado o NO_{ex}. Ao final do experimento, os fragmentos pulmonares foram retirados e corados com hematoxilina e eosina, com a técnica histoquímica cianeto resistente para peroxidase eosinofílica (células EPO+), com a técnica imunoistoquímica para a detecção da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e com resorcina-fucsina, resorcina-fucsina oxidada e picro-sírius. A medula óssea foi retirada e corada com hematoxilina e eosina. O índice de edema peribrônquico, as células EPO+, os mononucleares e os polimorfonucleares brônquicos e os eosinófilos da medula óssea foram avaliados por morfometria. As células epiteliais brônquicas nNOS+ e as fibras elásticas e colágenas foram avaliadas por densitometria óptica. Os anticorpos IgG₁ foram detectados por anafilaxia cutânea passiva. A análise estatística foi feita com o programa *SigmaStat* e considerado significativo um P<0,05. **RESULTADOS:** Nos grupos TO1 e TO2 houve aumento no tempo de inalação, diminuição na resposta máxima de elastância do sistema respiratório após desafio antigênico e com metacolina, diminuição do edema peribrônquico, dos eosinófilos, dos polimorfonucleares, das fibras elásticas e colágenas, da eosinofiloiose e dos títulos de IgG₁ (P < 0,05). Os mononucleares, a resposta máxima de resistência do sistema respiratório depois do desafio antigênico, e a metacolina diminuíram em TO2 (P < 0,05). O NO_{ex} e a percentagem de células epiteliais nNOS+ não foram alterados nos grupos tolerizados. **CONCLUSÕES:** A indução de tolerância oral concomitante ao início da sensibilização ou depois de estabelecida a resposta alérgica foi capaz de atenuar a inflamação eosinofílica, os títulos de IgG₁ e o remodelamento brônquico presentes neste modelo de inflamação crônica pulmonar. A redução dos linfomononucleares e da hiper-

responsividade brônquica foi mais efetiva quando a indução de tolerância foi feita em animais previamente sensibilizados. A dissociação entre o controle da inflamação eosinofílica e a avaliação do NO_{ex} e da expressão da nNOS no epitélio brônquico sugere um mecanismo novo ativado pela indução de tolerância oral.

Descritores: 1. Asma 2. Tolerância imunológica
3. Hiper-reatividade brônquica 4. Óxido nítrico 5. Cobaias

SUMMARY

Ruiz VC. Role of oral tolerance induction in airway remodeling and the expression of neuronal nitric oxide synthase. [Thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2006.

INTRODUCTION: The oral tolerance induction attenuates the inflammatory response and the production of secondary anaphylactic antibodies present in pulmonary allergy pictures in humans as well as in experimental models. In these situations, the bronchial remodeling modulation and the role of nitric oxide have not been previously studied. **OBJECTIVES:** **1.** To develop two models of oral tolerance in guinea pigs with chronic pulmonary inflammation, characterizing: pulmonary mechanics, hyperreponsiveness to methacholine, exhaled nitric oxide (NO_{ex}), IgG1 antibodies, bronchial inflammation and eosinophylopoiesis. **2.** To evaluate the bronchial remodeling and the expression of the neuronal nitric oxide synthase enzyme (nNOS) in bronchial epithelium of these animals. **METHODS:** The guinea pigs were submitted to ovalbumin or saline solution inhalation for 15 minutes or until they presented respiratory stress (this time period was called inhalation time). The protocol was repeated twice a week for 4 weeks. Oral tolerance induction was carried out by the administration of 2% oral ovalbumin, offered *ad libitum*, and the following groups were formed: 1. OT1 (received 2% oral ovalbumin from the first ovalbumin inhalation; 2. OT2 (received 2% oral ovalbumin from the fourth ovalbumin inhalation; 3. SAL (received water *ad libitum* and saline solution inhalations; and 4. OVA (received water *ad libitum* and ovalbumin solution inhalations). After being anesthetized, the animals were ventilated and evaluated regarding: 1. basal pulmonary mechanics and after

ovalbumin (30mg/ml) or saline solution inhalation; 2. bronchial hyperresponsiveness to methacholine; and 3. NO_{ex} was collected. At the end of the experiment, the pulmonary fragments were removed and stained with hematoxylin-eosin, with the cyanide-resistant eosinophilic peroxidase histochemical technique (EPO+ cells), with the immunohistochemical technique for the detection of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and with Resorcin-fuchsin, Resorcin-fuchsin with oxidation and Picrosirius. The bone marrow was removed and stained with hematoxylin-eosin. The index of peribronchial edema, the EPO+ cells, the bronchial mononuclear and polymorphonuclear cells and the eosinophils from the bone marrow were evaluated by morphometry. The epithelial bronchial nNOS+ cells and the elastic and collagen fibers were evaluated by optical densitometry. IgG1 antibodies were detected by Passive Skin Anaphylaxis. Statistical analysis was performed with the *SigmaStat* software program and a P value < 0.05 was considered significant. **RESULTS:** The OT1 and OT2 groups showed increased inhalation time, decrease in the maximum elastance response of the respiratory system after the antigenic challenge and with methacholine, decrease of peribronchial edema, eosinophils, polymorphonuclear, elastic and collagen fibers, eosinophylopoiesis, and IgG1 titers (P < 0.05). The mononuclear cells, the maximum resistance response of the respiratory system after the antigenic challenge and methacholine decreased in OT2 (P < 0.05). NO_{ex} and the percentage of nNOS+ epithelial cells were not altered in the tolerized groups. **CONCLUSIONS:** The oral tolerance induction concomitant to the start of sensitization or after the allergic response has been established, was capable of attenuating the eosinophilic inflammation, IgG1 titers and the bronchial remodeling present in this model of chronic pulmonary inflammation. The decrease in

lymphomononuclear cells and bronchial hyperresponsiveness was more effective when the tolerance induction was carried out in animals that had been previously sensitized. The dissociation between the eosinophilic inflammation and NO_{ex} evaluation and the expression of nNOS in the bronchial epithelium suggests a new mechanism activated by the oral tolerance induction.

Descriptors: 1. Asthma 2. Immunological tolerance

3. Bronchial hyperreactivity 4. Nitric oxide 5. Guinea pigs

1

INTRODUÇÃO

1.1. ASMA BRÔNQUICA

1.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Segundo dados da *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2005) aproximadamente 300 milhões de pessoas de todas as idades e etnias sofrem de asma, sendo uma das doenças crônicas mais comuns e responsável por uma a cada 250 mortes no mundo. Além disso, a asma é uma importante causa de morbidade e gera um significativo impacto social e econômico (GINA, 2005; Lugogo e Kraft, 2006).

O aumento da prevalência da asma na população tem sido observado praticamente em todos os continentes, em 0,7 a 18,4% da população geral, havendo variações conforme a região e o país (GINA, 2005). A prevalência na população em geral nos Estados Unidos vem aumentando nas últimas décadas (*Centers for Disease Control* - CDC). Os últimos dados da GINA (2005) mostraram que essa proporção é de 10,9% da população. Pesquisas recentes nos Estados Unidos também apontaram uma estatística similar, em que 12% das crianças menores de 18 anos apresentam sintomas de asma (Bloom e Dey, 2006).

Em outros países observa-se um cenário bastante semelhante. No Sul da Austrália, a prevalência de asma aumentou significativamente em todas as idades, sendo constatado um aumento em mulheres de 7,8% em 1990 para 14,6% em 2003 e um aumento na população masculina de 7,8% para 9,4% (Wilson *et al.*, 2006). O *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998a) demonstrou que essa prevalência em crianças aumentou em vários países, sendo que a prevalência de "sibilos no último ano" aumentou de 2,1% para 32,2% nas crianças de 13/14 anos e de 4,1% para 32,1% nas crianças de 6/7 anos. Segundo esse sistema, a prevalência dos sintomas de asma foi mais alta nos países de língua inglesa, como Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia, seguida pela América do Norte, América Central e América do Sul (ISAAC, 1998b).

No Brasil, a prevalência de asma está entre as maiores do mundo, conforme dados encontrados no estudo ISAAC (1998a). Entre 1994 e 1995, a prevalência de asma cumulativa teve uma cifra nacional de 14,9% no grupo de 13/14 anos e 13,1% no de 6/7 anos. Quando foram considerados os sintomas apenas dos últimos 12 meses (asma ativa), a prevalência no país foi de 22,7% e 23,3%, respectivamente, para os grupos de 13/14 anos e 6/7 anos (ISAAC, 1998a).

Segundos dados da GINA (2005), a prevalência de asma no Brasil é de aproximadamente 11,4% da população total. Dados interessantes foram obtidos por Maia *et al.* (2004) em um estudo transversal com o questionário ISAAC, acrescido de perguntas sobre exposições de interesse, auto-aplicado em 3.770 escolares de 13 e 14 anos de idade do Município de Montes Claros (MG). Os

resultados mostraram que a prevalência de "sibilos no último ano" foi de 15,8%, e de "asma ou bronquite alguma vez na vida" de 23,8%. Essa alta prevalência parece estar associada, nesse estudo, ao contato com animais domésticos e/ou a um histórico familiar de asma e localização urbana das escolas.

A asma é subestimada nas estatísticas de mortalidade que consideram apenas a causa básica de morte, entretanto, esses dados são bastante valorizados dada a possibilidade de serem, na sua maioria, potencialmente evitáveis. Os avanços no tratamento da asma não se traduzem em queda das taxas de mortalidade na maior parte do mundo (GINA, 2005).

Entre 1980 e 1989, a mortalidade da população russa por asma aumentou de 3,7 para 5,3 por 100.000 habitantes (Oganov e Maslennikova, 1999). Nos Estados Unidos, segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estimaram em 20 milhões (72 por 1.000) o número de pacientes com asma. Isso representa 14 milhões de adultos (68 por 1.000) e 6,1 milhões de crianças (83 por 1.000). Segundo o CDC, nesse mesmo ano ocorreram 4.261 mortes por asma ou 1,5 por 100.000. Segundos dados obtidos no GINA (2005), a mortalidade está aumentando nos Estados Unidos, principalmente na raça negra. No entanto, no Uruguai, a taxa de mortalidade por 100.000 habitantes diminuiu de 6,08 para 3,39 no período de 1984-1998, o que se associou à maior venda de corticosteróides inalatórios (Baluga *et al.*, 2001).

No Brasil, o número de óbitos é 1,8 por 100.000 asmáticos (GINA, 2005). Os dados disponibilizados pelo Datasus (Sistema de Informações Hospitalares do

Sistema Único de Saúde), do Ministério da Saúde, advindos de registros administrativos de atendimentos hospitalares que abrangem a parcela dos atendimentos prestados à população pelo Sistema Único de Saúde (SUS), podem refletir uma óptica parcial da situação no Brasil. Segundo este sistema, o número de mortes notificado em nosso país por asma em 2005 foi de 784. Os óbitos ocorreram em maior proporção entre os maiores de 60 anos (489 óbitos) e entre os menores de 10 anos (90 óbitos), não tendo havido diferenças significativas nas taxas de mortalidade entre os sexos. Considerando as macrorregiões, os maiores coeficientes foram registrados na região Nordeste (350 óbitos) e Sudeste (282 óbitos) (Datasus).

Rio *et al.* (2002) demonstraram que, durante os triênios de 1983-1985 e 1993-1995, não houve aumento da mortalidade por asma brônquica no Município de São Paulo, considerando-se apenas a asma como a causa básica de morte. Embora a taxa de mortalidade por asma pareça estar estabilizada, as crises por asma brônquica foram responsáveis por 784 óbitos em nosso país em 2005 ou 0,27 óbito a cada 100 internações (Datasus).

Nos Estados Unidos, as crises de asma são responsáveis pela perda de 3 milhões de dias de trabalho por ano. Para as crianças é a principal causa de faltas escolares. Em média uma criança com asma falta três vezes mais à escola do que uma criança sem esse diagnóstico (Fowler *et al.*, 1992). No período de 1980 a 1993, as internações aumentaram 28% (16,8 para 21,4 por 10.000 habitantes) sendo as hospitalizações 3,4 vezes maiores em negros. Em 2002, ocorreram, nos Estados Unidos, 13,9 milhões de consultas médicas ambulatoriais. Os

atendimentos em serviços de emergência alcançaram 1,9 milhão - 67 por 10.000, com 484.000 internações. A taxa mais alta de hospitalização ocorreu em crianças com menos de 4 anos de idade (*Centers for Disease Control* - CDC).

No Brasil, segundo dados do Datasus, de janeiro a dezembro de 2005, a asma brônquica foi responsável por cerca de 300.000 internações, classificada como a segunda maior causa entre as doenças das vias respiratórias. Essas internações se refletiram em um gasto de R\$ 96.172.328,79.

A faixa etária é um tópico a considerar na avaliação das taxas de hospitalizações por asma no Brasil. O número de hospitalizações foi maior em menores de 5 anos e entre 5 e 10 anos, sendo constatadas 120.666 e 39.729 hospitalizações, respectivamente, em 2005 (Datasus).

Ao considerar os custos associados ao tratamento de asmáticos no Brasil, Oliveira *et al.* (2002) avaliaram a eficácia de um programa educacional para esses pacientes na redução de custos. Os autores demonstraram que o custo total de medicação por paciente foi reduzido a despeito do aumento dos custos relativos às medicações e visitas ambulatoriais. Nesse mesmo sentido, Gibson *et al.* (2001) apresentaram dados de uma revisão sistemática realizada pela *Cochrane Library*, que conseguiu reunir 58 estudos que tratavam de programas de educação aplicados em adultos portadores de asma. Essa revisão possibilitou concluir que a intervenção educacional leva ao melhor controle da asma, menor número de hospitalizações, menos visitas ao pronto-socorro, menos visitas não-agendadas

ao ambulatório, menor absenteísmo ao trabalho e à escola e menos episódios de asma noturna.

1.1.2. DEFINIÇÃO

Uma das mais recentes definições de asma é de 2005, realizada pela *Global Initiative for Asthma* (GINA): “A asma é uma doença crônica inflamatória de vias aéreas onde diversas células e elementos celulares desempenham um importante papel. A inflamação crônica causa aumento da hiper-responsividade que tem como consequência episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e pela manhã. Esses episódios estão normalmente associados à obstrução variável ao fluxo que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento”.

1.1.3. FATORES DE RISCO

A etiologia da asma é multifatorial e diversos fatores podem desencadear a hiper-responsividade observada na asma brônquica, como: alérgenos, poluentes ambientais, drogas, alterações ambientais e meteorológicas, infecções, exercício, aditivos em alimentos, irritantes químicos, e o estresse como desencadeador da

crise asmática, entre outros (Bjorksten, 1999; Cabral *et al.*, 1999; Gold, 2000; Von Mutius, 2000; GINA, 2005). O QUADRO 1 exemplifica os fatores individuais envolvidos no desenvolvimento da asma, fatores ambientais que podem influenciar a suscetibilidade para o desenvolvimento da asma em indivíduos predispostos e fatores que precipitam a exacerbação da asma e/ou causam persistência dos sintomas.

Visto que várias pessoas são expostas a substâncias semelhantes e nem todas desenvolvem a asma, a predisposição genética tem sido enfatizada como fator principal para o desenvolvimento da resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) a alérgenos inalatórios comuns (Grasemann *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; GINA, 2005).

A atopia e a hiper-responsividade brônquica não são características exclusivas da asma, entretanto, são apontadas como importantes fatores individuais para o desenvolvimento dessa doença (GINA, 2005). Indivíduos atópicos produzem grande quantidade de anticorpos tipo IgE desencadeada pelo contato com alérgenos ambientais comuns. A presença de IgE pode ser detectada no soro ou por meio de testes cutâneos para uma série de alérgenos (GINA, 2005; Pearce *et al.*, 1999).

QUADRO 1: Principais fatores de risco para asma (*Fonte:* modificado do GINA, 2005).

FATORES INDIVIDUAIS
Predisposição genética Atopia Hiper-responsividade das vias aéreas Sexo Raça/etnia
FATORES AMBIENTAIS
<p align="center">Fatores que influenciam a suscetibilidade para o desenvolvimento da asma em indivíduos predispostos</p> <p>ALÉRGENOS DOMÉSTICOS Ácaro Animais Barata Fungos, mofo, hifas</p> <p>ALÉRGENOS EXTERNOS Pólen Fungos, mofo, hifas</p> <p>AGENTES OCUPACIONAIS TABACO Fumante ativo e passivo</p> <p>POLUENTES Domésticos e ambientais</p> <p>INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS Hipótese da higiene</p> <p>INFECÇÕES PARASITÁRIAS FATORES SOCIOECONÔMICOS TAMANHO FAMILIAR DIETA E DROGAS OBESIDADE</p> <p align="center">Fatores que precipitam a exacerbação da asma e/ou causa persistência dos sintomas</p> <p>Alérgenos domésticos e externos Poluentes domésticos e externos Infecções respiratórias Exercício e hiperventilação Mudanças climáticas Dióxido de enxofre Comidas, aditivos, drogas Condição emocional Fumaça de cigarro Irritantes tal como <i>sprays</i> domésticos e tintas</p>

Uma avaliação da associação entre prevalência de atopia e prevalência de asma foi feita no estudo de Pearce *et al.*, 1999. Nesse estudo foi descrito que aproximadamente 58% das crianças e 54% dos adultos com asma apresentaram “prick test” positivo, entretanto 29% das crianças não-asmáticas e 24% dos adultos não-asmáticos também apresentaram positividade no “prick test”. A proporção de casos de asma atribuídos à atopia foi em média de 38% em crianças e 37% em adultos.

Considerando o broncoespasmo induzido pelo exercício, sabe-se que isso ocorre em 40 a 90% dos asmáticos (GINA, 2005). Cabral *et al.* (1999) avaliaram se havia associação entre gravidade da asma e aumento de crises asmáticas desencadeadas pelo exercício e observaram que as crises asmáticas desencadeadas pelo exercício foram mais freqüentes em crianças com asma moderada e grave.

Entre os fatores de risco que se associam à piora do controle clínico de asmáticos, nota-se uma relação positiva entre o índice de massa corpórea (IMC) elevado e o aumento de risco de crises asmáticas (GINA, 2005; Shore e Johnston, 2006). Nos pacientes com IMC elevado, o controle dietético com redução de peso pode ser uma estratégia para ser associada ao tratamento da asma.

1.1.4. CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO

Segundo o último consenso realizado pelo GINA (2005), a asma pode ser classificada, de acordo com a frequência de sinais e sintomas decorrentes da limitação ao fluxo aéreo, da quantidade de β_2 agonista utilizado e nos testes de função pulmonar, em quatro diferentes estágios: intermitente, persistente leve, persistente moderada ou persistente grave. Os critérios sugeridos por esse consenso para a classificação da gravidade da asma antes do tratamento estão demonstrados na QUADRO 2. Entretanto, quando o indivíduo está sob tratamento medicamentoso sua classificação é baseada na medicação diária e na resposta ao tratamento (GINA, 2005).

QUADRO 2: Sinais clínicos e funcionais de gravidade da asma.

CLASSIFICAÇÃO DA ASMA
INTERMITENTE
Sintomas < 1x/semana Exacerbações breves Sintomas noturnos $\leq 2x/mês$ •PFE ou $VEF_1 \geq 80\%$ do predito •Variabilidade PFE ou $VEF_1 < 20\%$
PERSISTENTE LEVE
Sintomas > 1x/semana e < 1x/dia Exacerbações podem afetar a atividade e o sono Sintomas noturnos > 2x/mês •PFE ou $VEF_1 \geq 80\%$ do predito •Variabilidade PFE ou VEF_1 20-30%
PERSISTENTE MODERADA
Sintomas diários Exacerbações podem afetar a atividade e o sono Uso diário de inalações com β_2 agonista de curta duração Sintomas noturnos > 1x/semana •PFE ou VEF_1 60-80% do predito •Variabilidade PFE ou $VEF_1 > 30\%$
PERSISTENTE GRAVE
Sintomas diários Exacerbações freqüentes Sintomas noturnos freqüentes Limitação da atividade física •PFE ou $VEF_1 < 60\%$ do predito •Variabilidade PFE ou $VEF_1 > 30\%$

VEF_1 : volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE: pico de fluxo expiratório. (Fonte: GINA, 2005).

1.1.5. PATOGÊNESE DA ASMA

Nos pacientes asmáticos, do ponto de vista histopatológico, é possível notar que as vias aéreas se apresentam infiltradas por células mononucleares, que na sua grande maioria são representadas principalmente por linfócitos CD4+Th2+ e eosinófilos. Os mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos também se apresentam aumentados e com sinais de desgranulação mastocitária. Na luz das vias aéreas, o muco apresenta-se misturado a macrófagos ativados, linfócitos, eosinófilos e células epiteliais descamadas. O aumento de neutrófilos nas vias aéreas parece estar associado à maior gravidade do quadro asmático (Busse e Lemanske, 2001; Cohn *et al.*, 2004; GINA, 2005). Em paralelo com o processo inflamatório crônico, danos no epitélio brônquico estimulam o processo de reparação estrutural que ocorre de maneira anormal. Tal processo se refere ao remodelamento das vias aéreas, que será abordado adiante.

Para que todo esse processo ocorra, é necessário que as células apresentadoras de antígeno, no caso do pulmão, os macrófagos alveolares, as células epiteliais e, principalmente, as células dendríticas interajam com os linfócitos auxiliares (Th) e desencadeiem, por meio dos linfócitos B, a produção de IgE (Nakajima *et al.*, 1997). Esses anticorpos liberados na circulação se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos. Estudos epidemiológicos e observações clínicas apontam uma importante correlação entre os níveis de

anticorpos da classe IgE e a gravidade da asma (Burrows *et al.*, 1989; Varner e Lemanske, 2000).

Depois da exposição a baixas e repetidas doses de antígeno, indivíduos atópicos desenvolvem anticorpos do tipo IgE específicos àqueles alérgenos. Ocorrendo a sensibilização, uma exposição subsequente inicia a resposta humoral secundária. Após a ligação do antígeno à IgE de superfície dos mastócitos, ocorre ativação e desgranulação dessas células e está iniciada a resposta asmática imediata, na qual mastócitos, macrófagos, linfócitos T e células epiteliais liberam mediadores inflamatórios como histamina, cistelinil leucotrienos e prostaglandinas, entre outros mediadores, que induzem a contração aguda da musculatura lisa das vias aéreas.

Os grânulos liberados dos mastócitos podem ainda causar várias alterações como agressão epitelial, anormalidades no controle neural autônomo do tônus da via aérea, hipersecreção de muco e aumento da responsividade do músculo liso das vias aéreas (Bousquet *et al.*, 2000; GINA, 2005). Os mediadores inflamatórios também causam alteração microvascular e conseqüente extravasamento de plasma para dentro das vias aéreas e contribuem para o estreitamento aéreo (Bousquet *et al.*, 2000).

Uma vez sintetizados e ativados, os anticorpos IgE circulam no sangue e então se ligam aos receptores de alta afinidade (FcεRI) na superfície dos mastócitos teciduais, nos basófilos do sangue periférico e ao receptores IgE de

baixa afinidade (FcεRII, ou CD23) na superfície de linfócitos, eosinófilos, plaquetas e macrófagos.

Após ocorrer a sensibilização, um novo contato com o antígeno inicia a resposta asmática imediata, que é caracterizada por um quadro que se instala em poucos minutos e que, do ponto de vista histopatológico, é evidenciado por edema de mucosa, aumento do tônus do músculo liso com constrição das vias aéreas, associados à desgranulação mastocitária (Pauwels, 1989). O pico dessa resposta em humanos parece ocorrer em cerca de 10 a 20 minutos e costuma finalizar-se em torno de 1 a 2 horas após a exposição ao antígeno (Wills-Karp, 1999). A contração da musculatura lisa brônquica nessa fase parece ser o principal fator da obstrução da luz das vias aéreas e pode ocorrer em cerca de metade dos pacientes asmáticos e na maioria dos modelos experimentais (Harris *et al.*, 1995).

A liberação dos mediadores acima citados é responsável pela migração de eosinófilos, linfócitos T e neutrófilos para as vias aéreas, caracterizando o início da fase tardia da resposta asmática (Bousquet *et al.*, 1990; Santing *et al.*, 1994; Schuiling *et al.*, 1998). Esta pode iniciar-se de 3 a 6 horas após o contato com o antígeno e persistir por horas ou dias, caso não haja tratamento adequado. Normalmente, essa reação costuma resolver-se em torno de 24 horas (Wills-Karp, 1999). É definida em humanos como uma redução de 20% no VEF₁ após inalação padronizada de agonista broncoconstritor, que tenha causado resposta aguda equivalente a 20% de queda do VEF₁ (Durham *et al.*, 1984). Em modelos animais, particularmente em cobaias, parece existir duas respostas asmáticas tardias,

sendo a primeira em torno de 17 horas após o contato com o antígeno e a segunda normalmente em 72 horas (Hutson *et al.*, 1988).

A agressão nas vias aéreas desencadeada por várias respostas tardias pode levar ao remodelamento das vias aéreas de maneira anormal e contribuir para que não ocorra reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar (Tiddens *et al.*, 2000).

1.1.6. CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

Um grande número de células inflamatórias está envolvido na resposta inflamatória na asma brônquica. Neste item abordaremos as principais células inflamatórias, bem como suas funções no mecanismo da asma brônquica.

A patogênese da asma é bastante complexa, como foi exposto, e envolve a interação de uma variedade de células inflamatórias e mediadores inflamatórios. Inicialmente, as células ativas nas vias aéreas liberam citocinas e quimiocinas na circulação, estimulando a liberação de leucócitos inflamatórios e seus precursores, da medula óssea para a circulação. O recrutamento das células inflamatórias, incluindo eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos para as vias aéreas, ocorrem por um aumento na expressão de uma série de moléculas de adesão na superfície das células sanguíneas (Bentley *et al.*, 1993). Em seguida, ocorre o rolamento dos leucócitos e a união das moléculas de adesão aos seus

ligantes específicos presentes nessas células. Desse processo resulta uma firme adesão dos leucócitos ao endotélio microvascular, o que desencadeará a passagem dessas células inflamatórias para o tecido pulmonar (GINA, 2005).

Em circunstâncias normais, o mecanismo da apoptose (morte celular programada) limita a agressão tecidual inflamatória e promove a resolução da inflamação. Entretanto, em indivíduos asmáticos, ocorre aumento da sobrevivência das células inflamatórias por mecanismos que reduzem a apoptose celular (GINA, 2005).

Os mastócitos são considerados como a célula primária e de grande importância na resposta alérgica imediata (Busse, 1998) e também podem contribuir com o remodelamento das vias aéreas pela liberação dos fatores de crescimento (Busse e Lemanske, 2001). A presença de receptores de alta afinidade para IgE é uma das características dos mastócitos e basófilos. A ativação mastocitária é desencadeada pela ligação IgE da membrana citoplasmática da célula ou como resposta à ação de citocinas (Busse, 1998). Níveis altos de IgE aumentam o número de receptores e, portanto, o potencial de desgranulação dessas células (Broide, 2001).

Quando os mastócitos são ativados, o conteúdo granular perde a natureza cristalina, o complexo torna-se solúvel e os mediadores como a histamina, as proteases e os proteoglicanos são liberados para o ambiente extracelular. A histamina participa na reação alérgica imediata, desenvolvendo vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa

brônquica e aumento da secreção de muco. Uma população de mastócito libera proteases do tipo triptase que potencializa a contração de brônquios induzida pela histamina (Johnson *et al.*, 1997) e outra população libera triptase e quimase (Brusse e Lemanske, 2001). Portanto, os mastócitos podem também estar envolvidos no remodelamento das vias aéreas pela liberação das quimases, que, por sua vez, contribuem para o depósito de colágeno na membrana basal (Jordana, 1993; Kofford *et al.*, 1997).

Os mastócitos são capazes de produzir vários mediadores como, por exemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 (IL, interleucina), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e mediadores lipídicos como leucotrieno C₄ e prostaglandina D₂ (Walls *et al.*, 2001).

Os linfócitos exercem um papel fundamental na fisiopatogenia da reação asmática. Antes de interagirem com o antígeno, são chamados de precursores ou *naïves* (Th0) e, uma vez estimulados (por citocinas apropriadas ou sinais celulares), diferenciam em células efectoras ou de memória (plasmócitos, células Th *helper* ou auxiliares, citotóxicas ou supressoras) (Abbas *et al.*, 2000).

Os linfócitos T dividem-se em duas categorias, de acordo com os marcadores de superfície e atividade. Os que expressam as moléculas de membrana CD4⁺ (CD significa do inglês: *cluster of differentiation*) participam principalmente da imunidade humoral e são chamadas de células T auxiliares, enquanto as células T que expressam CD8⁺ são chamadas de citotóxica e

participam, sobretudo, da resposta imune celular e interagem com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I. Os linfócitos CD4⁺ são ainda subclassificados pelas citocinas que secretam em linfócitos CD4⁺Th1 e linfócitos CD4⁺Th2. Os primeiros secretam IL-2 e IFN- γ , que são essenciais para os mecanismos de defesa do organismo, e o segundo, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL13, que são mediadores da resposta inflamatória alérgica.

Existe ainda um outro subtipo das células T, as células T reguladoras (Treg), as quais servem para limitar respostas inflamatórias, e os linfócitos CD4⁺Th3, que produzem altos níveis de TGF- β (fator transformador do crescimento beta) com várias quantidades de IL-4 e IL-10, e não participam da resposta alérgica (Mosmann e Sad, 1996; Larche *et al.*, 2003; Fehervari e Sakaguchi, 2004; Van Oosterhout e Bloksma, 2005)

Os linfócitos possuem um importante papel na orquestração da resposta inflamatória asmática, sobretudo por meio das células Th2, que sintetizam citocinas que participam do processo da elaboração da IgE, maturação e ativação de mastócitos e basófilos, assim como na infiltração eosinofílica, determinando dano epitelial (Street e Mosman, 1991; Kips, 2001).

Os eosinófilos são os leucócitos granulócitos numericamente predominantes na asma brônquica. São formados na medula óssea e quando maduros possuem um núcleo bilobulado e abundantes grânulos intracelulares (Abbas *et al.*, 2000). A associação entre eosinófilos e asma já é conhecida de longa data (Ellis, 1908). Na atualidade, os eosinófilos são considerados células pró-inflamatórias e

participantes do processo de remodelamento das vias aéreas (Jeffery, 2004) e estão relacionados com a hiper-responsividade brônquica (Sampson, 2001).

A eosinofiloiose é regulada por diversos mediadores, entre eles a IL-13, a IL-5 e o GM-CSF (fator de crescimento de colônia de granulócitos e macrófagos) (Sampson, 2001). A IL-5 é a citocina que tem grande especificidade para eosinófilos, sendo crucial para a diferenciação seletiva dessas células, estimulando também sua liberação da medula óssea para a circulação periférica e atua ampliando a sobrevivência destas células no tecido (Sanderson, 1992). Foster *et al.* (1996) mostraram que a deficiência genética de IL-5 leva à marcante diminuição no número de eosinófilos no sangue e no tecido pulmonar após os camundongos receberem o desafio antigênico em um modelo de inflamação alérgica pulmonar.

Uma das características que mais distingue os eosinófilos de outras células são os numerosos grânulos. O eosinófilo quando maduro contém proteínas catiônicas, como a básica principal (MBP), a catiônica eosinofílica (ECP), a neurotóxica de eosinófilos (EDN), e também a peroxidase de eosinófilos (EPO). Essas proteínas são tóxicas para parasitas, bactérias, células tumorais e principalmente para o epitélio das vias aéreas (Bousquet *et al.*, 2000; Sampson 2001). Além das proteínas granulares, eosinófilos ativados podem liberar também mediadores lipídicos, radicais livres de oxigênio, eicosanóides e citocinas de classe Th2 (Ying *et al.*, 1995).

A participação dos eosinófilos no remodelamento das vias aéreas e fibrose tem sido associada a sua capacidade de liberar fatores de crescimento (Weller 1991), elastase (Lungarella *et al.*, 1992) e metaloproteinases (Ohno *et al.*, 1997).

Os macrófagos e seus precursores, os monócitos, são fagócitos mononucleares originados da medula óssea e possuem a capacidade de reconhecer antígenos, fagocitar microrganismos e partículas, apresentar antígenos aos linfócitos T e liberar uma grande quantidade de substâncias e mediadores (Hawrylowicz *et al.*, 2001). Os macrófagos quando ativados liberam leucotrienos, prostaglandinas, tromboxano, fator ativador plaquetário (PAF), provocando uma ativação em cadeia de mediadores inflamatórios. A IL-1, cuja fonte principal nas vias aéreas é o macrófago, induz a secreção de muco, sendo fundamental na ativação de linfócitos T e um importante co-estimulador da expansão de células Th2. Os macrófagos podem ainda contribuir para remodelamento das vias aéreas através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, tal como o derivado das plaquetas (PDGF), principal de crescimento de fibroblasto e TGF- β (Kovacs e DiPietro, 1994). Podem ainda sintetizar elastase e um grupo de metaloproteinases, que tem a capacidade de degradar várias macromoléculas da matriz extracelular, incluindo a elastina (Senior *et al.*, 1989).

Os neutrófilos, também chamados de leucócitos polimorfonucleares, podem determinar lesão tecidual significativa por meio da produção de prostaglandinas, tromboxano, LTB₄ (leucotrieno B₄), PAF, assim como pela liberação de radicais livres de oxigênio e proteases. É possível que os neutrófilos contribuam para o processo de fibrose na asma pela produção de TGF- β e MMP-9

(metaloproteinase-9) (Wenzel, 2001). Embora alguns estudos tenham demonstrado a presença de neutrófilos no escarro (Fahy *et al.*, 1993), no lavado broncoalveolar e em biópsia brônquica de pacientes asmáticos (Lacoste *et al.*, 1993), essas células ainda são encontradas em pequeno número, fazendo com que o papel dos neutrófilos na patogênese da asma ainda não esteja totalmente estabelecido. No entanto, alguns autores observaram aumento no número de neutrófilos durante reações tardias após o contato com o antígeno (Montefort *et al.*, 1994), em biópsias de pacientes que morreram de asma (Carroll *et al.*, 1996), em pacientes que apresentam asma noturna e em pacientes corticóide-dependentes (Tanizaki *et al.*, 1993).

1.1.7. PRINCIPAIS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A asma envolve a ativação de muitas células inflamatórias que liberam mediadores inflamatórios que resultam nas alterações típicas dessa doença. Entre essas células incluem mastócitos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas, basófilos, neutrófilos e plaquetas, e também as células epiteliais, células do músculo liso, células endoteliais e fibroblastos. Os mediadores inflamatórios produzem muitos efeitos nas vias aéreas, incluindo broncoconstrição, exsudação de plasma, secreção de muco, estímulo neurogênico, quimiotaxia e ativação de células inflamatórias, assim como alterações estruturais, incluindo a fibrose pelo depósito de colágeno.

Vários são os mediadores liberados pelas principais células inflamatórias envolvidas na fisiopatogenia da asma, entre eles histamina, prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador plaquetário (PAF), citocinas, quimiocinas, radicais livres de oxigênio, endotelinas, proteinases, entre outros (Barnes *et al.*, 1998; Chung e Barnes, 1999).

A histamina é sintetizada e liberada principalmente por mastócitos e também basófilos, quando ocorre a desgranulação dessas células em resposta a mecanismos imunológicos e não-imunológicos, e seu principal efeito é a broncoconstrição. Níveis plasmáticos aumentados de serotonina são encontrados em asmáticos, entretanto, por não ser considerado um mediador constritor nas vias aéreas em humanos, sua função não é considerada relevante. A maior fonte de serotonina em humanos são as plaquetas, sendo também encontrada em células neuroendócrinas (Barnes *et al.*, 1998). O aumento dos níveis de adenosina tem sido encontrado no sangue e nas vias aéreas de asmáticos e representa um agonista broncoconstritor (Driver *et al.*, 1993). Seus efeitos broncoconstritores são indiretos, sendo um potente mediador da desgranulação de mastócitos, causando, portanto, liberação de histamina por essas células (Barnes *et al.*, 1998).

As primeiras etapas da síntese de mediadores por meio do metabolismo do ácido araquidônico ocorrem na membrana nuclear de células inflamatórias em decorrência de vários estímulos, como antígenos de diversas naturezas, citocinas, complexos imunes e cálcio. Esses estímulos geram a formação de um segundo mensageiro que ativa a fosfolipase A₂ do citoplasma. Essa enzima inicia a

metabolização do ácido araquidônico, gerando os eicosanóides: 1. pela via da cicloxigenase, originando prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina; ou 2. pela via da lipoxigenase, gerando as lipoxinas (LX) e os leucotrienos (LT).

O produto mais abundante da enzima cicloxigenase gerado por ativação imunológica dos mastócitos em pulmão de humanos é a prostaglandina (PG) D₂ (PGD₂). A PGD₂ é gerada por mastócitos humanos após eles serem ativados por intermédio de receptor para IgE ou por cálcio ionóforo. Os efeitos biológicos das prostaglandinas estimuladoras - PGD₂, PGF_{2α} -, gerados durante reações mastócito-dependentes nos tecidos, incluem contração de musculatura lisa peribrônquica, permeabilidade vascular, sensações de prurido e dor e agregação plaquetária, além de desgranulação (O'Byrne, 1997; White, 1999).

As lipoxinas são as mais recentes descobertas da família dos produtos bioativos gerados a partir do ácido araquidônico e podem ter ações tanto pró-inflamatórias como antiinflamatórias. Elas inibem a quimiotaxia de neutrófilos e sua adesão, mas estimulam a adesão de monócitos.

A LXA₄ (lipoxina A₄) estimula a vasodilatação e atenua a vasoconstrição induzida pelo leucotrieno C₄. Há uma relação inversa entre a quantidade de lipoxinas e leucotrienos formados, sugerindo que as lipoxinas possam ser contrarreguladores endógenos da ação dos leucotrienos (Hedqvist *et al.*, 2000; Serhan *et al.*, 2000).

Há duas classes principais de leucotrienos: 1. cisteínicos (CisLTs), leucotrienos C₄, D₄, e E₄, assim chamados porque contêm o aminoácido cisteína

agregado ao ácido graxo; e, 2. não-cisteínicos, leucotrieno B₄, que é um diidroxi LT e não contém cisteína.

São mediadores lipídicos (ácidos graxos) que modulam vários aspectos da resposta inflamatória que se estabelece nas vias aéreas de pacientes asmáticos, tais como contração da musculatura lisa peribrônquica, aumento da secreção de muco, dilatação das vênulas pós-capilares, aumento da permeabilidade vascular, e também contribuem para a exsudação de macromoléculas e formação de edema peribrônquico (Henderson Jr., 1994; Wenzel *et al.*, 1994; Bisgaard, 2000; Bisgaard, 2001).

O fator ativador plaquetário é um fosfolípídio que atua como quimiotático para diversas células inflamatórias, incluindo plaquetas, macrófagos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos. Induz também o aumento da responsividade brônquica à histamina e à acetilcolina *in vivo* (Barnes *et al.*, 1998).

Na asma, uma vez que o epitélio tenha sido danificado em decorrência da inflamação, ocorre exposição de terminações nervosas sensitivas, que podem ser estimuladas por substâncias inaladas e também por mediadores inflamatórios, determinando a ativação de potentes neuropeptídios, tais como a substância P (SP) e a neurocinina A (NKA), podendo causar, além da contração da musculatura lisa, vasodilatação e conseqüente edema e secreção de muco (Barnes, 1991; Widdicombe, 1998).

O sistema NANC (sistema não-adrenérgico não-colinérgico), composto de um conjunto de fibras sensitivas não-mielinizadas cujos processos terminais

atingem as células epiteliais, os vasos, a musculatura lisa peribrônquica e as glândulas submucosas, é formado por um componente inibidor cuja estimulação causa broncodilatação (i-NANC), e outro excitatório (e-NANC), que, ao ser ativado, induz a broncoconstrição (Widdicombe, 1998). No pulmão, a SP e a NKA são as principais representantes do sistema e-NANC e o NO do sistema i-NANC (Widdicombe, 1998). Os efeitos do óxido nítrico serão abordados com mais detalhe no capítulo 1.4.

Diferentes citocinas estão envolvidas na fisiopatogenia da asma, sendo produzidas por diferentes tipos celulares, entre eles, mastócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos. As citocinas desempenham um importante papel na coordenação e na persistência do processo inflamatório na asma. Considerando que diferentes descobertas são continuamente feitas sobre as complexas interações entre as citocinas e suas funções na fisiopatogenia da asma, torna-se difícil agrupá-las, bem como determinar todas as suas funções. Entretanto, Barnes *et al.* (1998) e Chung e Barnes (1999) as classificam de maneira didática em:

- a) Linfocinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-16 e IL-17.
- b) Citocinas pró-inflamatórias: IL-1, TNF, IL-6, IL-11, GM-CSF e SCF (fator célula-tronco).
- c) Citocinas antiinflamatórias: IL-10, IL-1ra, IFN- γ , IL-12 e IL-18.

- d) Citocinas quimiotáticas (quimiocinas): RANTES (regulada sob ativação, expressa e secretada pelos linfócitos T), proteína quimiotática de monócitos (MCP)-MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1 α , eotaxina e IL-8.
- e) Fatores de crescimento: PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), TGF- β , FGF (fator de crescimento do fibroblasto), EGF (fator de crescimento da epiderme) e IGF (fator de crescimento tipo insulina).

1.2. REMODELAMENTO BRÔNQUICO

1.2.1. ASPECTOS GERAIS

O remodelamento brônquico é um termo que se refere a um processo dinâmico de reconstrução de estruturas celulares ou dos tecidos. Entretanto, na asma, postula-se que no remodelamento brônquico ocorram mudanças na composição, no conteúdo e na organização dos constituintes celulares e moleculares do trato respiratório (Shiba *et al.*, 2002). O processo inflamatório crônico das vias aéreas, característico da doença, poderia ser a principal causa da reconstrução das suas estruturas de maneira anormal e irreversível (Jeffery, 2004). Essa reconstrução anormal, dita remodelamento brônquico, é, portanto, uma tentativa de manter as vias aéreas intactas e restringir o processo agressor representado pela resposta inflamatória (Roche *et al.*, 1989; Laitinen *et al.*, 1993; Li e Wilson, 1997).

O desenvolvimento de várias respostas tardias pode levar ao remodelamento das vias aéreas e contribuir para que não ocorra reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas. Entretanto, inflamação e remodelamento não representam uma simples relação de causa e efeito, visto que o controle da resposta inflamatória com corticosteróides pode não afetar o controle do processo de remodelamento (Tiddens *et al.*, 2000, Cohn *et al.*, 2004).

É conhecido que, além do processo inflamatório crônico, o remodelamento brônquico também foi associado a determinantes genéticos da asma e a estímulos mecânicos sobre as vias aéreas (Tschumperlin e Drazen, 2001).

O termo remodelamento brônquico foi utilizado inicialmente por Huber e Koessler (1992) para descrever as alterações estruturais observadas nas vias aéreas de asmáticos. Atualmente alguns autores associam o remodelamento brônquico como um contribuinte para a obstrução das vias aéreas, da hiper-responsividade e das alterações na função pulmonar (Grol *et al.*, 1999; McParland *et al.*, 2003; Vignola *et al.*, 2003a).

1.2.2. ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DAS VIAS AÉREAS

As alterações estruturais encontradas no processo de remodelamento incluem: fibrose subepitelial, alteração das glândulas mucosas, espessamento da parede da via aérea, hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa, hiperplasia e aumento do número de miofibroblasto, proliferação vascular e mudanças na matriz extracelular, tal como depósito de fibras de colágeno e fragmentação de fibras elásticas (Mauad *et al.*, 1999; Bousquet *et al.*, 2000; Elias, 2000; Chiappara *et al.*, 2001; Vignola *et al.*, 2003a; McParland *et al.*, 2003; Jeffery, 2004; Pascual e Peters, 2005; Yamauchi, 2006).

Com o remodelamento, a parede das vias aéreas torna-se espessada, variando de 10 a 300% do normal, o que compromete a luz das vias aéreas. A camada subepitelial em asmáticos também se espessa, variando de 7 a 23 micrômetros (normal até quatro) e isso ocorre à custa de depósito de colágenos I, II e V, fibronectina e tenascina. Os miofibroblastos que representam as principais células produtoras de colágenos estão hiperplasiados e a área ocupada pela musculatura lisa aumenta em torno de três vezes (Roche *et al.*, 1989; Homer e Elias, 2000; Cohn *et al.*, 2004).

O epitélio brônquico pode ser lesado na asma, havendo descamação intensa de células e redução do número de cílios por célula epitelial. Observa-se também na via aérea metaplasia de células caliciformes e, em menor grau, metaplasia escamosa, fenômenos aparentemente relacionados à regeneração epitelial (Fahy, 2001; Vignola *et al.*, 2003a).

O dano epitelial na asma pode estar associado a alguns fatores como ação dos produtos derivados da degradação de eosinófilos, entre eles a proteína básica principal que tem fator citotóxico epitelial, radicais livres de oxigênio, proteases, edema subepitelial, entre outros (Fahy, 2001; Vignola *et al.*, 2003a; Jeffery, 2004). O epitélio brônquico alterado é fonte importante de mediadores, de quimiocinas e de fatores de crescimento, sustentando o processo inflamatório característico da asma (Chung e Barnes, 1999; Bisset e Schmid-Grendelmeier, 2005). O epitélio de asmáticos produz maiores quantidades de IL-8 e GM-CSF (fator de crescimento de colônia de granulócitos e macrófagos) que os controles. O aumento de IL-4 e IL-13 potencializa a liberação epitelial de IL-8, GM-CSF e

RANTES. A IL-8 estimula o recrutamento de neutrófilos e o GM-CSF estimula a sobrevivência de eosinófilos, ativa macrófagos e ativa as células dendríticas (Lordan *et al.*, 2002; Reibman *et al.*, 2003).

A descamação do epitélio expõe as vias aéreas às agressões inaladas. Essas alterações participam do desenvolvimento dos sintomas de hiper-responsividade das vias aéreas e contribuem ativamente para o desenvolvimento e perpetuação da doença (Omari *et al.*, 1993; Rennard *et al.*, 1995).

A hiperplasia e a hipertrofia de glândulas submucosas são alterações importantes na anatomia patológica da asma e contribuem para a produção excessiva de muco presente principalmente na asma fatal. Além disso, o muco apresenta maior concentração de substâncias viscoelásticas. Uma outra alteração estrutural descrita em vias aéreas asmáticas é a ectasia de ductos glandulares (Bousquet *et al.*, 2000; Yamauchi, 2006).

Na asma, e principalmente nos casos de asma fatal, há fortes evidências que ocorre angiogênese (Salvato, 2001; Lazaar e Panettieri, 2005), embora possa ser o tamanho e não o número de vasos sangüíneos que esteja aumentado (Chu *et al.*, 2001). Esse processo é atribuído à ação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, entre eles o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) liberado pelas células do músculo liso das vias aéreas (Bousquet *et al.*, 2000; Lazaar e Panettieri, 2005).

O fluxo sangüíneo na mucosa apresenta-se aumentado e este mecanismo tem implicações no remodelamento brônquico, contribuindo com o edema,

espessamento da parede brônquica e conseqüente diminuição do calibre interno das vias aéreas (Salvato, 2001).

O músculo liso brônquico é um dos principais alvos de atenção entre os estudiosos da asma. A hiperplasia do músculo liso (Woodruff *et al.*, 2004; Lazaar e Panettieri, 2005), a hipertrofia (Benayoun *et al.*, 2003; Lazaar e Panettieri, 2005) e a migração dessas células em direção ao lúmen aéreo, possivelmente por alterações na matriz extracelular (Madison, 2003; Lazaar e Panettieri, 2005), são os principais contribuintes para o espessamento da camada muscular e alteração na parede das vias aéreas.

As células do músculo liso liberam uma variedade de mediadores que estão envolvidos na patogênese da asma, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos (FIGURA 1) (Joubert e Hamid, 2005).

O espessamento da camada muscular das vias aéreas e a liberação de seus mediadores são também considerados alterações que distinguem a gravidade da asma. A esse respeito, Pepe *et al.* (2005) avaliaram biópsias endobrônquicas de indivíduos com asma grave e moderada e encontraram um aumento na área das vias aéreas, da expressão da IL-8 e da eotaxina no músculo liso das vias aéreas em indivíduos com asma grave, comparativamente aos indivíduos com asma moderada.

FIGURA 1: Esquema representativo das células do músculo liso das vias aéreas e seus principais mediadores. GM-CSF: fator de crescimento de colônia de granulócitos e macrófagos; IL: interleucina; IFN- γ : Interferon gama; LIF: fator inibidor da migração dos leucócitos; MCP: proteína quimiotática de monócitos; PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas; PGE₂: prostaglandina E₂; SCF: fator célula-tronco; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; ADAM: desintegrina e metaloproteinase; PLA₂: fosfolipase A₂ (Fonte: Joubert e Hamid, 2005).

A membrana basal é uma fina camada da matriz extracelular especializada que forma a estrutura mantenedora para o crescimento epitelial e promove o suporte mecânico. É composta por três camadas: a lâmina lúcida adjacente às células epiteliais, a lâmina densa e a camada reticular (lâmina *reticularis*). Na asma, ocorre espessamento e fibrose da lâmina *reticularis* da membrana basal por depósito anormal dos componentes da matriz extracelular, tais como fibras de colágeno tipos I, III e V, fibronectina, tenascina e laminina (Bousquet *et al.*, 2000; Elias, 2000; Vignola *et al.*, 2001; McParland *et al.*, 2003 ; Yamauchi, 2006).

Brewster *et al.* (1990) demonstraram uma relação positiva entre espessamento da membrana basal e um número aumentado de miofibroblastos na submucosa de vias aéreas asmáticas. Portanto, como o miofibroblasto é a fonte do colágeno, é plausível que seja fonte da fibrose subepitelial.

Payne *et al.* (2003) examinaram biópsias endobrônquicas e constataram espessamento da membrana basal reticular em crianças e adultos com asma, comparativamente aos indivíduos controles. Chetta *et al.* (1997) e Boulet *et al.* (1997) evidenciaram relação positiva entre a espessura da membrana basal e a gravidade clínica da asma. Já Lambert *et al.* (1994) teorizaram que o espessamento da membrana basal na asma teria um efeito protetor, por representar uma carga maior ao músculo, atenuando os efeitos da broncoconstrição.

O depósito de colágeno nas vias aéreas asmáticas é uma importante alteração estrutural (Bousquet *et al.*, 2000; Jeffery, 2004) e, portanto, um potencial marcador do remodelamento brônquico em modelos experimentais de asma (Palmans *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2005b).

Na lâmina própria de vias aéreas intraparenquimatosas de cobaias, os dois componentes fibrilares da matriz extracelular estão representados: fibras do sistema elástico aparecem entremeadas por fibrilas do sistema colágeno; os dois elementos fibrilares de ambos os sistemas aparecem dispostos tanto longitudinal como transversalmente. Tal configuração confere às vias aéreas elasticidade e resistência (Leick-Maldonado, 1996).

Wilson e Li (1997) demonstraram, por meio de métodos imunoistoquímicos e análise de imagens, que, além do espessamento da membrana basal reticular, ocorre depósito de colágeno na região submucosa em biópsias de indivíduos asmáticos, comparativamente a indivíduos controles. Ao considerar que na camada submucosa as fibras elásticas, as fibras de colágeno e os miofibroblastos formam bandas longitudinais nas vias aéreas, Carrol *et al.* (2000) quantificaram a área e o número de bandas longitudinais em casos de asma fatal, não-fatal e indivíduos controles. Seus resultados revelaram aumento da área das bandas longitudinais e alterações na sua composição, com aumento de colágeno e miofibroblastos. Prado *et al.* (2005b) também demonstraram em modelo experimental de inflamação crônica alérgica em cobaias que o conteúdo de colágeno na parede das vias aéreas (incluindo a adventícia) estava aumentado e essa resposta foi ainda maior com o tratamento com L-NAME (L-NG-nitroarginina metil éster, inibidor da óxido nítrico sintase). Em um trabalho subsequente, os mesmos autores constataram que o bloqueio específico da iNOS (óxido nítrico sintase induzida), pelo tratamento crônico com 1.400 W, foi capaz de reduzir o conteúdo de fibras de colágeno na parede brônquica em cobaias com inflamação pulmonar crônica (Prado *et al.*, 2006).

As fibras do sistema elástico no pulmão regulam a patência das vias aéreas e o recolhimento elástico pulmonar (Bousquet *et al.*, 1996; Mauad *et al.*, 1999; Leick-Maldonado *et al.*, 1997). São constituídas pelas fibras elásticas propriamente ditas (também conhecidas somente como fibras elásticas), fibras elaunínicas e fibras oxitalânicas. Ultra-estruturalmente, as fibras do sistema

elástico dos mamíferos estão formadas por dois componentes, a elastina (confere elasticidade) e as microfibrilas (confere resistência), que se encontram ligados pelo fenômeno da elastogênese (Ross, 1973; Montes, 1996; Leick-Maldonado, 1996; Ushiqui, 2002). As características estruturais das fibras do sistema elástico estão demonstradas na FIGURA 2. As fibras elásticas propriamente ditas ou simplesmente fibras elásticas são formadas por um cilindro central de elastina rodeado por microfibrilas; as fibras elaunínicas são formadas por microfibrilas estremeadas por elastina e as fibras oxitalânicas, por sua vez, apresentam somente microfibrilas.

FIGURA 2: Representação esquemática das fibras do sistema elástico mostrando diferentes graus de depósito de microfibrilas e proteína amorfa (elastina) (Fonte: Leick-Maldonado, 1996).

A distribuição das fibras do sistema elástico nas vias aéreas intraparenquimatosas de cobaias foi esquematicamente demonstrada no trabalho de Leick-Maldonado (1996). Por meio da microscopia de luz e microscopia eletrônica, os autores conduziram à hipótese de que as vias aéreas apresentam

uma paliçada de fibras do sistema elástico logo abaixo da membrana basal epitelial. As fibras elásticas propriamente ditas estariam no tecido peribrônquico e também na lâmina própria juntamente com as fibras elastínicas. As fibras oxitalânicas, finas e inextensíveis, atravessam perpendicularmente o músculo liso das vias aéreas, fazendo conexão da rede de fibras subepiteliais àquelas localizadas na adventícia do tecido brônquico.

Ao considerar as características das fibras elásticas presentes nas vias aéreas, Leick-Maldonado *et al.* (1997) descreveram, em cobaias, que ocorre um mecanismo de delaminação dessas fibras dentro da camada subepitelial. Uma parte dessas fibras permanece aderida à membrana basal e, portanto, seguindo as invaginações da mucosa da via aérea que ocorrem no broncoespasmo, enquanto a outra permanece adjacente ao músculo liso das vias aéreas. Essa configuração sustenta a teoria de que as fibras do sistema elástico têm participação na modulação da broncoconstrição.

Na asma, as alterações das fibras do sistema elástico ainda representam um aspecto bastante discutido. Godfrey *et al.* (1995), estudando material de necrópsia e biópsias com microscopia eletrônica e análise de imagens, não conseguiram demonstrar diferença estatisticamente significativa na quantidade de fibras elásticas entre asmáticos e não-asmáticos.

Bousquet *et al.* (1996), usando técnicas histoquímica e imunoistoquímica, estudaram as fibras do sistema elástico da camada submucosa em 40 biópsias brônquicas de pacientes asmáticos de diferentes gravidades. Os autores

observaram fragmentação na camada superficial, provavelmente devido à elastólise, e espessamento na camada profunda da submucosa. Os autores atribuíram essas alterações ao processo inflamatório e à liberação de elastase e metaloproteinases associados ao edema.

Corroboram com estes achados o trabalho de Mauad *et al.* (1999) que evidenciaram a presença de duas camadas de fibras do sistema elástico na mucosa das vias aéreas: uma rede superficial, aderida à membrana basal, e uma rede mais profunda, próxima ao músculo liso das vias aéreas. Por meio de análise morfométrica, os autores encontraram elastose nas vias aéreas proximais de asmáticos, quando a espessura total da mucosa foi considerada. Considerando apenas a rede superficial, o conteúdo do sistema elástico estava significativamente diminuído. Além disso, nessa região, as fibras mostram-se fragmentadas, desordenadas e esparsas ao nível óptico. Os autores sugerem que a ação de proteases e elastases liberadas por células inflamatórias e um fator mecânico (edema e distensão) seriam as possíveis causas da ruptura e fragmentação dessas fibras.

A perda de acoplamento das fibras do sistema elástico na membrana basal poderia resultar em uma diminuição da força elástica das vias aéreas, que determina seu relaxamento deficiente e facilita o mecanismo de broncoconstrição. A principal consequência funcional da elastose nas vias aéreas centrais seria o aumento da espessura das vias aéreas, potencializando o efeito da contração do músculo liso brônquico. As fibras do sistema elástico das vias aéreas periféricas não se mostraram alteradas neste estudo.

Mauad *et al.* (2004) quantificaram, em estudo de necropsia de 15 asmáticos falecidos por asma e em nove controles, o número de ligações alveolares alteradas e analisaram o conteúdo de fibras elásticas na camada adventícia das pequenas vias aéreas e nos septos alveolares. Os autores demonstraram aumento nas ligações alveolares anormais e menor quantidade de fibras elásticas na camada adventícia das pequenas vias aéreas e nos alvéolos peribrônquicos, mas não nos alvéolos distais. Esses achados indicam que as alterações estruturais nas áreas peribronquiolares possam contribuir para a patogênese das alterações funcionais de recolhimento elástico observadas em asmáticos graves.

Um dos mecanismos que vem sendo estudado para a compreensão do remodelamento, que envolve as alterações na matriz extracelular, é a participação das metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (Atkinson e Senior, 2003; Matsumoto *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006).

As MMPs são uma família de proteinases neutras responsáveis pelo processo de remodelamento que ocorre em situações fisiológicas como na embriogênese e no reparo de lesões teciduais. Atuam na degradação de colágeno, fibras elásticas e outros componentes da matriz extracelular e também têm um papel na migração celular clivando moléculas de adesão e inativando várias citocinas (Madri e Graesser, 2000).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) estão envolvidas na regulação da atividade proteolítica e são basicamente classificadas conforme a proteína a ser clivada em collagenases, gelatinases e stromeolisina (Vignola *et al.*, 1997). As

MMPs compõem um grande subgrupo da família da metaloproteinase e vários membros continuam sendo identificados (Parks e Shapiro, 2001). Entretanto, é conhecido que a MMP-2 (gelatinase A), a MMP-3 (stromeolisina-1), MMP-9 (gelatinase B) e a MMP-12 (metaloelastase) estão aumentadas em asmáticos. A MMP-9 parece ser a principal (Kelly e Jarjour, 2003; Ohbayashi e Shimokata, 2005), estando aumentada no sangue, no fluido do lavado broncoalveolar, no escarro e em biópsias de asmáticos (Kelly *et al.*, 2000; Atkinson e Senior, 2003).

As MMPs têm inibidores teciduais denominados TIMPs (Atkinson e Senior, 2003). O remodelamento brônquico é o resultado, principalmente, da interação entre a MMP-9 e seu inibidor, chamado TIMP-1 (Chiappara *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006). No pulmão, sob condições anormais, a MMP-9 pode ser produzida por uma variedade de células como eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, linfócitos, células dendríticas, entre outras (Ohno *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2000; Atkinson e Senior, 2003; Ohbayashi e Shimokata, 2005) e ativar mecanismos de reparação inadequados como a ativação da produção de TGF- β (fator transformador do crescimento beta), aumentando a síntese de colágenos pelos fibroblastos que, por sua vez, estimula os processos fibróticos (Lee *et al.*, 2001; Atkinson e Senior, 2003). Entretanto, alguns autores detectaram que o declínio da relação MMP/TIMP ou o excesso de TIMP-1 também pode levar a um aumento da proliferação de miofibroblastos, acúmulos dos componentes da matriz extracelular e fibrose (Gomez *et al.*, 1997; Vignola *et al.*, 1998a; Mautino *et al.*, 1999; Atkinson e Senior, 2003). Alguns autores sugerem que a degradação dos componentes da matriz extracelular pelas

MMPs e outras proteinases ocorra na fase imediata da asma e a produção aumentada de TIMP-1 possa ocorrer na fase tardia deste processo (Chiappara *et al.*, 2001; Vignola *et al.*, 2003a). Corroborando com essa teoria, Tanaka *et al.* (2000) demonstraram quantidades aumentadas de MMP-9 em pacientes na fase imediata da asma. Matsumoto *et al.* (2005), avaliando os níveis de MMP-9 e TIMP-1 no escarro de 26 pacientes com quadro estável de asma, encontraram tanto aumento de TIMP-1 quanto correlação positiva com o espessamento da parede das vias aéreas. Entretanto, Cho *et al.* (2006), utilizando modelo experimental de remodelamento de vias aéreas em camundongos, demonstraram aumento de MMP-9 no epitélio das vias aéreas e de MMP-9 e TIMP-1 nas células inflamatórias peribrônquicas, além de depósito aumentado de colágeno peribrônquico. Os autores demonstraram que o aumento da MMP-9 e o da TIMP-1 podem ocorrer simultaneamente, porém em diferentes locais nas vias aéreas remodeladas.

Outro componente importante no remodelamento é a relação entre a elastase e seu principal inibidor, a $\alpha 1$ - antitripsina (Vignola *et al.*, 1998b; Vignola *et al.*, 2001; Vignola *et al.*, 2003b). A elastase, cuja principal fonte é os neutrófilos e também os macrófagos e eosinófilos, em concentrações aumentadas degrada as fibras do sistema elástico, como exemplificado nos estudos de Bousquet *et al.* (1996) e Mauad *et al.* (1999). Confirmando esses achados, Vignola *et al.* (2003b) demonstraram porcentagem aumentada de elastase, de neutrófilos e eosinófilos no escarro induzido de pacientes asmáticos, comparados com indivíduos

controles. Também foi constatado elevados níveis de α 1-antitripsina possivelmente como mecanismo compensatório para os altos níveis de elastase.

Contudo, os fibroblastos são considerados "células-chave" no processo de reparo tecidual, podendo diferenciar-se em miofibroblastos, células indispensáveis ao processo de reparo (Yamauchi, 2006). Vários mediadores podem regular a proliferação de fibroblastos, incluindo: PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), IL-1, TNF (fator de necrose tumoral), TGF- β , citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), endotelinas, fator de crescimento epidérmico, GM-CSF (fator de crescimento de colônia de granulócitos e macrófagos) e triptase (Elias, 2000). São responsáveis pela produção de uma variedade de componentes da matriz extracelular, como colágeno, reticulares e elásticas, laminina, fibronectina, ácido hialurônico, glicoproteínas da substância extracelular amorfa e proteoglicanos (Sheppard e Harrison, 1992; Vignola *et al.*, 2001; Spoelstra *et al.*, 2001). Além disso, os miofibroblastos ativados podem ainda contribuir com a inflamação, produzindo diferentes tipos de citocinas e quimiocinas (Spoelstra *et al.*, 2001).

Dando ainda mais complexidade ao mecanismo de remodelamento, acresce-se a participação dos eosinófilos e dos linfócitos Th2 e suas citocinas. Os eosinófilos têm papel fundamental no processo de remodelamento, uma vez que causam lesão epitelial e principalmente porque estimulam a fibrogênese por meio da produção de TGF- β , citocina que regula a produção de colágeno (Vignola *et al.*, 1997). Os linfócitos Th2 e suas citocinas apresentam um importante papel na orquestração dessa resposta, particularmente eosinófilos, e suas citocinas podem ainda interagir com a "unidade trófica do epitélio mesenquimal" (UTEM,

denominação dada à interação epitélio, músculo liso peribrônquico e miofibroblastos) e aumentar a inflamação crônica e o remodelamento das vias aéreas. Em células epiteliais brônquicas, as IL-4 e IL-13 são efetivas na promoção da liberação de TGF- β (Holgate *et al.*, 2003).

Há alguns anos tem sido intensamente discutida a possibilidade de a asma ser uma doença tanto das vias aéreas quanto do parênquima alveolar propriamente dito. Vários estudos na literatura em humanos e modelos experimentais de asma demonstraram as alterações nas estruturas das vias aéreas centrais e periféricas (Bousquet *et al.*, 1996; Mauad *et al.*, 1999; Carrol *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2001; Tsuchiya *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2005b). Entretanto, alguns autores justificam que o parênquima alveolar também está comprometido na asma. A esse respeito, Kraft *et al.* (1996) mostraram que ocorre uma infiltração de eosinófilos e macrófagos em vias aéreas distais, mais especificamente na região do tecido alveolar. Lanças *et al.* (2006) demonstraram que, além das alterações nas respostas de mecânica do sistema respiratório, pode ocorrer ainda uma resposta de aumento na responsividade do tecido pulmonar de cobaias com inflamação crônica das vias aéreas, observada por meio da curva dose-resposta específica (com ovoalbumina) e inespecífica (metacolina) em sistema da mecânica oscilatória.

Pelo que foi exposto, o complexo binômio inflamação-remodelamento tem sido motivo de inúmeras pesquisas, dada a sua complexidade e importância na irreversibilidade do padrão obstrutivo respiratório na asma.

1.3. HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA

1.3.1. ASPECTOS GERAIS

Responsividade das vias aéreas é um termo que descreve a capacidade de estreitamento das vias aéreas depois da exposição ao agonista constritor. Então, a hiper-responsividade brônquica consiste em um aumento acima do normal no grau de fechamento das vias aéreas a um estímulo similar (Postma e Kerstjens, 1998; Lötvald *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; O'Byrne e Inman, 2003). Entretanto, quando são utilizadas drogas que exerçam efeito broncoconstritor, a hiper-responsividade brônquica pode ser caracterizada tanto por uma resposta mais precoce (hipersensibilidade), indicada por concentrações mais baixas do agonista constritor necessário para iniciar a resposta de broncoconstrição, assim como pela magnitude da broncoconstrição induzida (hiper-reatividade) (Lötvald *et al.*, 1998; O'Byrne e Inman, 2003).

A asma está quase invariavelmente associada à hiper-responsividade brônquica e essa resposta pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos, podendo ser específicos, inespecíficos e até mesmo físicos (Postma e Kerstjens, 1998; Lötvald *et al.*, 1998; GINA, 2005). Como a intensidade da hiper-responsividade está associada com a intensidade da asma e com a quantidade de tratamentos necessários para o controle dos sintomas, a avaliação dessa

resposta tem sido considerada de grande importante na prática clínica (Lötvall *et al.*, 1998; O'Byrne e Inman, 2003; GINA, 2005).

A responsividade brônquica pode ser avaliada laboratorialmente pela realização de curvas dose-respostas a agonistas broncoconstritores, como a metacolina, a adenosina ou a histamina (Lötvall *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 2000; O'Byrne e Inman, 2003; GINA, 2005). A curva dose-resposta é geralmente realizada por inalação de doses ou concentrações crescentes do agonista broncoconstritor e a função pulmonar medida inicialmente e após os desafios. Os resultados são expressos como a dose responsável para produzir uma queda de 20% no VEF₁ (volume expiratório forçado no primeiro segundo, PD₂₀) ou a concentração necessária para produzir uma queda de 20% no VEF₁ (PC₂₀). O PC₂₀ menor que 8 mg/ml confirma a presença de hiper-reatividade das vias aéreas, comparativamente com PC₂₀ maior que 16 mg/ml em indivíduos não-asmáticos. (Lötvall *et al.*, 1998; O'Byrne e Inman, 2003; GINA, 2005).

Em modelos experimentais, o efeito do agonista broncoconstritor administrado por via inalatória ou intravenosa é medido pela metodologia de análise da mecânica pulmonar, na qual as medidas de pressões no sistema respiratório, variações de volume e fluxo aéreo, possibilitam a obtenção de parâmetros como resistência e elastância pulmonar. A curva dose-resposta para o agonista broncoconstritor adquire geralmente um formato sigmóide se o efeito (resistência ou elastância) é colocado no eixo das ordenadas e a concentração do agonista é colocada no eixo das abscissas. Nesse caso, o desvio da curva dose-resposta para a esquerda é indicativo de aumento da sensibilidade, enquanto um

aumento da resposta máxima ou platô significa maior reatividade brônquica. A reprodução da curva dose-resposta em ratos utilizando metacolina por via intravenosa foi realizada em nosso laboratório por Arantes-Costa *et al.* (2002).

1.3.2. PRINCIPAIS DETERMINANTES DA HIPER-RESPONSIVIDADE BRÔNQUICA

Na asma, os determinantes das respostas de hipersensibilidade e hiper-reatividade por meio da avaliação da curva dose-resposta ao agonista broncoconstritor não estão totalmente esclarecidos e, portanto, não podem ser avaliados separadamente. Entretanto, sabe-se que podem ser representados tanto por fatores pré-juncionais quanto pós-juncionais, como alterações da musculatura lisa peribrônquica, lesão epitelial, disfunção da regulação neuronal, alteração da permeabilidade vascular, ações de mediadores inflamatórios e disfunção da regulação do sistema nervoso (O'Byrne e Inman, 2003).

Fundamentalmente, o processo inflamatório e as alterações nas estruturas das vias aéreas pelo remodelamento brônquico, demonstrados no capítulo anterior, são os principais fatores contribuintes para a hiper-reatividade brônquica na asma (Brusasco *et al.*, 1998; O'Byrne e Inman, 2003; Brown *et al.*, 2006; Yamauchi, 2006).

1.4. ÓXIDO NÍTRICO

1.4.1. ASPECTOS GERAIS

O óxido nítrico (NO) presente na fumaça de cigarros e escapamento dos veículos automotores é considerado um poluente atmosférico há longa data (Norman e Keith, 1965), um destruidor da camada de ozônio e um precursor da chuva ácida (Culotta e Koshland, 1992). O óxido nítrico passou a ser reconhecido como molécula essencial na fisiologia de diversos órgãos do corpo humano na década de 1980, quando Furchgot e Zawadzki (1980) observaram que a presença das células endoteliais era de fundamental importância no relaxamento arterial causado pela acetilcolina, por liberarem um fator relaxante dependente do endotélio. Alguns anos depois, Palmer *et al.* (1987) e Ignarro *et al.* (1987), em grupos independentes, conseguiram mostrar que o fator relaxante dependente do endotélio, encontrado em veias e artérias, é análogo ao óxido nítrico.

O NO desempenha um importante papel em muitos processos fisiológicos e patológicos e regula uma variedade de funções dentro das células e tecidos. É um neurotransmissor do sistema i-NANC (componente inibitório do sistema não-adrenérgico não-colinérgico) que atua como broncodilatador (Ricciardolo, 2003; Ricciardolo *et al.*, 2004), pode ser encontrado em abundância no sistema nervoso central e periférico (Knowles *et al.*, 1989), e como um neurotransmissor clássico

na regulação da motilidade gastrointestinal, fluxo sanguíneo regional e função neuroendócrina. No cérebro, ele exerce influência na formação da memória e na intensidade das respostas a estímulos dolorosos (Christopherson e Bredt, 1997). Além disso, Kobzik *et al.* (1994) mostraram que o óxido nítrico está presente na musculatura esquelética regulando tanto o metabolismo como a contratilidade muscular. Em grandes concentrações, pode ter efeito citotóxico e citostático, atuando na defesa do organismo contra tumores e patógenos (Moncada e Higgs, 1993; Ricciardolo *et al.*, 2004).

A produção de óxido nítrico ocorre quando um grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina é quebrado, por meio de oxidação enzimática (Moncada *et al.*, 1989; Michel e Feron, 1997; Ignarro, 2002), gerando óxido nítrico e L-citrulina e não D-arginina (Culotta e Koshland, 1992; Moncada e Higgs, 1993). A L-arginina é transportada para o interior celular por um sistema de transporte (aminoácido catiônico) e pode ser metabolizada por dois grupos distintos de enzimas: as óxido nítrico sintases e a arginase (Ricciardolo *et al.*, 2004).

Existem três tipos de isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo duas delas constitutivas e uma induzida: a isoforma neuronal ou tipo I (nNOS) (Bredt *et al.*, 1990; Ricciardolo *et al.*, 2004), a isoforma induzida ou tipo II (iNOS) (Xie *et al.*, 1992; Hamid *et al.*, 1993; Ricciardolo *et al.*, 2004) e a isoforma endotelial ou tipo 3 (eNOS) (Lamas *et al.*, 1992; Ricciardolo *et al.*, 2004). Todas as isoformas atuam utilizando a molécula de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para transformar a L-arginina em L-citrulina e assim liberar o óxido nítrico (Ricciardolo *et al.*, 2004).

As isoformas nNOS e eNOS, por serem constitutivas, estão presentes normalmente em situações fisiológicas. Além disso, são enzimas cálcio-dependentes e capazes de produzir baixas quantidades de óxido nítrico. A isoforma eNOS foi descoberta primeiramente nas células endoteliais (Lamas *et al.*, 1992) e o óxido nítrico formado a partir dessa enzima é responsável por manter o tônus vascular baixo e prevenir a aderência leucocitária e de plaquetas na parede vascular (Ignarro, 2002).

A isoforma nNOS está presente, principalmente, nos neurônios (Vizzard *et al.*, 1995) e nervos, porém já foi também encontrada na musculatura lisa das vias aéreas (Patel *et al.*, 1999) e nas células epiteliais (Asano *et al.*, 1994). O óxido nítrico derivado dessa isoforma atua como neuromodulador e/ou neuromediador tanto em nível central como periférico e nas terminações nervosas dos nervos do sistema não-adrenérgico não-colinérgico, particularmente como mediador do i-NANC (Bult *et al.*, 1990; Li e Rand, 1991; Belvisi *et al.*, 1991; Imasaki *et al.*, 2001), causando broncodilatação.

A isoforma induzida (iNOS) está presente principalmente em situações patológicas e sua estimulação produz grandes quantidades de óxido nítrico. A presença dessa isoforma foi demonstrada inicialmente em macrófagos, no entanto sabe-se que pode atuar em uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo o endotélio vascular, desempenhando, assim, funções múltiplas na resposta inflamatória (Meng *et al.*, 2000; Birrell *et al.*, 2003; Offer *et al.*, 2003). Com o grande número de estudos que avaliaram a presença de iNOS em diversos órgãos, sabe-se que essa isoforma pode estar presente em diferentes tipos

celulares, incluindo as células epiteliais (Guo *et al.*, 1995), os macrófagos (Hibbs *et al.*, 1987), os neutrófilos (McCall *et al.*, 1991; Cerchiaro *et al.*, 2001), os eosinófilos e os linfomononucleares (Del Pozo *et al.*, 1997).

1.4.2. EFEITOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA FISIOPATOLOGIA DA ASMA BRÔNQUICA

O papel do óxido nítrico na gênese e modulação de diferentes processos inflamatórios parece depender do local onde é produzido, da quantidade produzida e da enzima que a produz. Seus efeitos têm sido intensamente estudados em diferentes modelos experimentais, mas não somente de asma (De Boer *et al.*, 2001; Lührs *et al.*, 2002; Koarai *et al.*, 2002; Birrell *et al.*, 2003; Kenyon *et al.*, 2003; Poon *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2006).

Considerando a ação do óxido nítrico na fisiopatogenia da asma brônquica, alguns autores sugerem que a disfunção das enzimas óxido nítrico sintase parece exercer tanto efeito benéfico quanto maléfico (Meurs *et al.*, 2003), alterando aspectos relevantes da patologia da asma, particularmente no recrutamento de células inflamatórias (Schuiling *et al.*, 1998), na hiper-responsividade das vias aéreas (Meurs *et al.*, 2002) e, mais recentemente, no processo de remodelamento (Hogaboam *et al.*, 1998; Ricciardolo, 2003; Ricciardolo *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2006).

O NO pode reagir com espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-), formando os compostos reativos nitrogenados, que exercem funções fisiológicas e na destruição de microrganismos. No entanto, quando as vias aéreas são expostas ao estresse oxidativo desencadeado pelo contato com poluentes, infecções, resposta inflamatória exacerbada ou mesmo em situações nas quais os sistemas antioxidantes do organismo estão diminuídos, as células inflamatórias e as células residentes nas vias aéreas geram superóxido (O_2^-) através da ativação de NADPH oxidase ou formam altas quantidades de óxido nítrico por aumento da expressão da iNOS. O NO reage com o superóxido e produz peroxidonitrito ($ONOO^-$). Este último pode levar à formação de nitrotirosina. Esta também pode ser formada a partir da exposição a NO_2^- em associação com o ácido hipocloroso (HOCl), MPO (mieloperoxidase) e EPO (peroxidase eosinofílica). Concentrações aumentadas de NO via iNOS, peroxinitrito e nitrotirosina podem contribuir para uma série de alterações e efeitos fisiopatológicos destrutivos nas vias aéreas (Ricciardolo *et al.*, 2004).

A L-arginina é o substrato comum tanto para a enzima óxido nítrico sintase quanto para a enzima arginase. O bloqueio de uma dessas vias enzimáticas pode afetar, por meio da competição de substrato, a atividade da outra (Meurs *et al.*, 2002; Ricciardolo *et al.*, 2004). Sendo assim, recentemente, alguns autores sugeriram que o bloqueio da produção de NO através do L-NAME seja uma ferramenta para o estudo indireto da participação da arginase em diversos processos fisiopatológicos (Meurs *et al.*, 2002). Os autores observaram que em estudos de traquéia isolada o bloqueio da arginase pela N ω -hidroxil-L-nor-

arginina (nor-NOHA) suprimiu a hiper-responsividade secundária ao estímulo antigênico. Por outro lado, a alta produção de NO pode ser também tóxica para as células. Contudo, é importante que o delicado balanço entre os efeitos benéficos e prejudiciais do óxido nítrico se mantenha e este parece ser modulado pelo metabolismo da L-arginina (Ricciardolo *et al.*, 2004).

Por meio de atuação nos nervos do sistema NANC, o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico por causar broncodilatação. No entanto, o óxido nítrico derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação nas arteríolas, com conseqüente extravasamento de plasma e edema. A grande quantidade de óxido nítrico é oriunda da enzima iNOS e resulta em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th2, principalmente por recrutamento eosinofílico, contribuindo para a fisiopatologia da asma (Barnes, 1996).

O óxido nítrico foi detectado no ar exalado de humanos e animais normais (Gustafsson *et al.*, 1991) e sua concentração está aumentada em pacientes asmáticos e em modelos experimentais de inflamação de vias aéreas. Contudo, o NO_{ex} (óxido nítrico exalado) tem sido utilizado como um marcador da resposta inflamatória na asma (Kharitonov *et al.*, 1994; Persson *et al.*, 1994; Belvisi, 1995; Deykin *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1997; Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Ricciardolo *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005a; Prado *et al.*, 2005b; Prado *et al.*, 2006) Alguns autores sugerem que o aumento do NO_{ex} (óxido nítrico exalado) possa ser decorrente do aumento da expressão da enzima NOS, particularmente da iNOS (Barnes, 1996).

Vários autores atribuem ao óxido nítrico um papel de mediador pró-inflamatório e a isoforma induzida é a principal isoforma envolvida nessa resposta (Hibbs *et al.*, 1987; Del Pozo *et al.*, 1997; Cerchiaro *et al.*, 2001). Alguns trabalhos também propõem que a isoforma neuronal tenha também um importante papel na inflamação (Samb *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2002). Sabe-se que existe expressão e/ou imunorreatividade de nNOS em diversas células envolvidas na inflamação, como em células linfomononucleares, neutrófilos (Greenberg *et al.*, 1998; Gatto *et al.*, 2000), eosinófilos e mastócitos (Maruo *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2002).

Trifilieff *et al.* (2000) mostraram que a enzima iNOS promove a inflamação das vias aéreas pelo aumento da expressão de citocinas em modelo de asma em camundongos. Também foi observado que, após a sensibilização, ocorreu um aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida. Corroborando esses achados, Prado *et al.* (2005a) demonstraram que o tratamento com L-NAME em cobaias sensibilizadas reduziu o número de eosinófilos e células mononucleares ao redor das vias aéreas. Estudo subsequente, realizado pelos mesmos autores, comparando o efeito do L-NAME administrado de forma aguda e crônica, revelou que o óxido nítrico possa ter um efeito protetor no remodelamento, pois sua inibição com L-NAME crônico aumentou o depósito de colágeno nas vias aéreas (Prado *et al.*, 2005b).

Portanto, além da participação do NO na resposta inflamatória, tem sido evidenciada uma possível participação no remodelamento das vias aéreas, embora ainda pouco estudado. Nesse sentido, Prado *et al.* (2006) investigaram a

contribuição das isoformas cNOS e iNOS na mecânica pulmonar, na resposta inflamatória e no depósito de fibras elásticas e colágenas nas vias aéreas no modelo experimental de inflamação crônica pulmonar alérgica em cobaias. Os animais receberam tratamento com L-NAME ou 1.400 W (inibidor específico da iNOS). Seus resultados revelaram que o tratamento com L-NAME aumentou a resistência das vias aéreas e o depósito de colágeno e diminuiu o edema, o recrutamento de células mononucleares e eosinófilos iNOS e nNOS positivos. Em contrapartida, o tratamento com 1.400 W reduziu a resistência do sistema respiratório, o recrutamento de células mononucleares e eosinófilos, o conteúdo de fibras elásticas e de colágeno nas vias aéreas e diminuiu somente o número de eosinófilos que expressaram iNOS. Os autores sugerem que o NO derivado da isoforma constitutiva possa ter um efeito protetor no remodelamento das vias aéreas.

A participação do NO na modulação da broncoconstrição também tem sido constantemente estudada (Dupuy *et al.*, 1992; Persson *et al.*, 1993; De Sanctis *et al.*, 1997; De Boer *et al.*, 1999; Prado *et al.*, 2005b; Prado *et al.*, 2006). Nesse sentido, Dupuy *et al.* (1992) observaram que a inalação de baixas doses de NO reduz significativamente o tônus basal e a broncoconstrição induzida pela metacolina em cobaias. A modulação da resposta de complacência pulmonar só ocorreu após o contato com doses altas de óxido nítrico inalatório. Os autores sugerem que um efeito broncodilatador mais significativo do NO ocorreu em vias aéreas proximais. Persson *et al.* (1993), estudando cobaias em modelo agudo de broncoconstrição induzida pela exposição ao aerossol de ovoalbumina,

constataram que o pré-tratamento com L-NAME aumentou a pressão inspiratória de forma significativa e a administração de óxido nítrico exógeno foi capaz de reverter esse efeito. De Sanctis *et al.* (1997) observaram que, em camundongos que apresentavam deficiência da enzima nNOS, ocorreu uma redução na concentração de NO exalado basal e na resposta máxima de responsividade à metacolina. De Boer *et al.* (1999), estudando traquéia isolada de cobaias sensibilizadas com ovoalbumina, mostraram que a deficiência de óxido nítrico endógeno, induzida pelo tratamento com L-NAME, aumentou a responsividade brônquica à metacolina após a reação asmática imediata, sendo esse fato revertido pela administração de L-arginina.

O papel do NO na fisiopatologia da asma vem sendo constantemente estudado, dada a sua importância no envolvimento dessa doença. Entretanto, não há estudos na literatura que avaliassem a influência da indução de tolerância oral nos valores de NO_{ex} bem com a importância das óxido nítrico sintases nessa resposta, particularmente das constitutivas uma vez que estudos prévios já demonstraram que o processo de tolerância é capaz de atenuar a resposta inflamatória pulmonar, particularmente a resposta eosinofílica (Haneda *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2006).

1.5. TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

1.5.1. ASPECTOS GERAIS

A tolerância imunológica é o fenômeno de supressão da resposta imunológica a um determinado antígeno quando ocorre sua exposição prévia. Tal mecanismo pode contribuir para a inibição da auto-reatividade patológica contra o próprio organismo, podendo prevenir o aparecimento de doenças auto-imunes. A indução de tolerância oral tem sido classicamente definida como supressão da resposta imunológica celular e/ou humoral a um determinado antígeno pela administração prévia do antígeno por via oral, sendo um processo natural contínuo de tolerância imunológica periférica (Siqueira, 2001; Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005; Dubois *et al.*, 2005).

Um dos primeiros relatos sobre os benefícios da tolerância oral utilizando antígenos protéicos foi feito por Wells (1911)¹ e Wells e Osborne (1911)². Esses autores demonstraram que ocorre resistência à anafilaxia para ovoalbumina (OVA) em cobaias previamente alimentadas com esse antígeno. A partir daí, a

¹ Wells HG. Studies on the hen's egg. *J Infect Dis.* 1911;8:147-71 apud Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol.* 1999;73:153-264.

² Wells HG, Osborne TB. Biological reactions of the vegetable proteins. *I Anaphylaxis J Infect Dis.* 1911;8:66-123 apud Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol.* 1999;73:153-264.

indução de tolerância pelo contato do antígeno nas mucosas vem sendo utilizada em modelos experimentais, mostrando resultados satisfatórios e eficazes, podendo contribuir para o controle de diversas manifestações imunologicamente mediadas, como, por exemplo, encefalomielite auto-imune experimental (Song *et al.*, 2004; Gonnella *et al.*, 2004), artrite experimental (Faria e Weiner, 2005; Min *et al.*, 2006), uveorretinite experimental (Thurau *et al.*, 1997; Torseth e Gregerson, 1998), *miastenia gravis* auto-imune experimental (Maiti *et al.*, 2004), diabetes em camundongos não-obesos e outras doenças não auto-imunes como aterosclerose, colites (Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005) e asma (Russo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002). Alguns autores apontam resultados satisfatórios da tolerância oral em humanos como no diabetes tipo 1 (Ergun-Longmire *et al.*, 2004) e em outras doenças como a esclerose múltipla e a artrite reumatóide (Weiner, 2004).

Diante dos possíveis benefícios decorrentes da indução de tolerância oral é crescente o número de pesquisas pelas quais são avaliados seus reais benefícios no controle das manifestações inflamatórias e funcionais da asma brônquica (Mucida *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2006). Em alguns estudos experimentais sugere-se que é possível, por meio da indução da tolerância por via oral, suprimir a resposta alérgica de padrão Th2 (Th, linfócito auxiliar), reduzindo o número de eosinófilos no pulmão e na medula óssea, bem como a produção de anticorpos específicos (Russo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2006).

A tolerância imunológica com o uso de imunoterapia para combater os sintomas asmáticos tem sido utilizada na prática clínica. Uma revisão sistemática

realizada por Abramson *et al.* (2003), incluindo 75 estudos clínicos controlados e randomizados, revelou que a imunoterapia à alérgenos específicos reduziu os sintomas da asma e a hiper-reatividade brônquica específica.

1.5.2. A IMUNOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL

A superfície da mucosa intestinal está exposta a uma grande variedade de antígenos, inclusive aos organismos patogênicos (Faria e Weiner, 2005; Dubois *et al.*, 2005). Contudo, o sistema digestório desenvolveu um mecanismo de defesa imunológica altamente especializado para identificar antígenos próprios e inócuos dos antígenos deletérios (Faria e Weiner, 2005).

A supressão imunológica da resposta Th1 e da resposta Th2 pode ser inibida pela administração por via oral do antígeno e depende da interação deste antígeno com o tecido linfóide associado ao intestino delgado (GALT). Este representa um sistema de defesa altamente especializado, do qual fazem parte as células epiteliais e os linfócitos intra-epiteliais T CD8+, sendo que alguns expressam a forma $\gamma\delta$ (gama-delta). Na lâmina própria encontramos linfócitos B e T CD4+, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos. As placas de Peyer são formadas por folículos linfóides organizados da mucosa do intestino e contêm células B e T (Faria e Weiner, 1999; Czerkinsky, 1999; Siqueira, 2001; Garside *et al.*, 2004; Faria e Weiner, 2005) (FIGURA 3).

FIGURA 3: Esquema representativo da mucosa do trato intestinal e de seus componentes celulares. Os linfócitos intra-epiteliais são linfócitos T CD8+, sendo que alguns expressam a forma $\gamma\delta$ (gama-delta). Na lâmina própria encontramos uma população de células mistas: linfócitos T, a maioria dos quais CD4+, linfócitos B, plasmócitos, bem como macrófagos, eosinófilos e mastócitos. A placa de Peyer são folículos linfóides organizados da mucosa do intestino e contém células B e T (*Fonte: Abbas et al., 2000*).

A administração por via oral de um antígeno pode desencadear os seguintes eventos: secreção de imunoglobulina A (IgA) na luz intestinal; ativação sistêmica do sistema imune, tanto a resposta celular quanto a formação de anticorpos; e finalmente a indução de um estado de tolerância imunológica local e sistêmica. Os dois primeiros mecanismos consistem em uma estratégia protetora aos patógenos invasores, enquanto o terceiro mecanismo impede reações locais e respostas imunes sistêmicas (Brandtzaeg, 1996; Czerkinsky, 1999; Faria e Weiner, 2005; Dubois *et al.*, 2005).

Os antígenos administrados por via oral passam através do epitélio da mucosa do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos, onde são iniciadas as respostas imunes. Alguns antígenos ingeridos também podem ser transportados através da célula M às placas de Peyer (Faria e Weiner, 1999; Garside *et al.*, 2004; Dubois *et al.*, 2005). No GALT, várias células são capazes de apresentar o antígeno aos linfócitos como macrófagos, células B, células do epitélio da mucosa e principalmente células dendríticas, que estão presentes na lâmina própria e na placa de Peyer (Faria e Weiner, 1999).

A maneira como o organismo reconhece o que deve ser atacado e o que deve ser tolerado pode ter estreita relação com as células apresentadoras de antígeno e com a característica do antígeno ingerido (Faria e Weiner, 1999; Smith *et al.*, 2000). A esse respeito, as células dendríticas têm sido apontadas como de grande importância na indução da tolerância, pois possuem a particular capacidade de ativar o sistema imunológico pela ativação de células T efectoras ou

induzir a um estado de hiporresponsividade pela ativação de células T reguladoras (Weiner, 2004; Kelsall e Leon, 2005).

1.5.3. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA ORAL

Tem-se constatado que existem dois principais mecanismos efetores na indução de tolerância oral: a indução de células T reguladoras que modulam a supressão ativa e a indução de deleção ou anergia clonal. Vários são os fatores que podem interferir com estes mecanismos, sendo que um dos fatores determinantes é a dose do antígeno administrado. Altas doses do antígeno levam à deleção clonal ou à anergia de células T, enquanto baixas e múltiplas doses induzem à imunossupressão através da liberação de citocinas supressoras como fator transformador do crescimento beta (TGF- β), interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) (Faria e Weiner, 1999; Rizzo *et al.*, 1999; Lundin *et al.*, 1999; Czerkinsky *et al.*, 1999; Weiner, 2000; Garside *et al.*, 2004; Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005; Dubois *et al.*, 2005) (FIGURA 4). É possível que os mecanismos de tolerância oral não sejam mutuamente exclusivos, podendo haver uma ação conjunta dos diferentes mecanismos contribuindo para o estabelecimento de um estado de tolerância. Há, contudo, a possibilidade de que haja o domínio de um ou outro mecanismo (Faria e Weiner, 1999).

FIGURA 4: Esquema representativo dos diferentes mecanismos de tolerância oral. Alta dose do antígeno administrado por via oral favorece o mecanismo de deleção clonal ou anergia das células T, enquanto baixa dose favorece a supressão celular ativa através da liberação de citocinas imunossupressoras como IL-4, IL-10 liberada pelas células Th2 e TGF- β liberado pelas células Th3 (Fonte: Faria e Weiner, 1999).

Outros mecanismos que possam interferir com o processo de indução de tolerância estão sendo investigados. Nesse sentido, podemos citar a função das células dendríticas na regulação da resposta imune no intestino (Kelsall e Leon, 2005; Dubois *et al.*, 2005), a participação das células T CD8+ com função reguladora e os mecanismos para a indução da supressão cruzada e sua importância na inibição das doenças auto-imunes (Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005). Keller *et al.*, (2006) sugerem, em modelo experimental de asma em camundongos, que as células dendríticas no intestino agem diferentemente das células dendríticas pulmonares, sendo que as primeiras atuam em células Th3 e estimulam a produção de TGF- β .

Na supressão cruzada, linfócitos que correspondem à imunização específica podem sofrer imunossupressão inespecífica a partir de células supressoras originárias de tolerância prévia a outro antígeno (Faria e Weiner, 1999; Weiner, 2004). Este fenômeno sugere que não é necessário conhecer o antígeno específico que ocasionou a resposta imune, mas sim o antígeno que, administrado por via oral, seja capaz de suprimir essa resposta imunológica (Faria e Weiner, 2005). A supressão cruzada tem sido demonstrada em alguns modelos animais de tolerância (Lundin *et al.*, 1996; Karlsson *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2005). Lundin *et al.* (1996) induziram tolerância oral em ratos adultos e jovens por meio da administração oral de ovoalbumina durante quatro semanas. Os animais foram imunizados com uma mistura de ovoalbumina e albumina do soro humano (HSA) (s.c., por via subcutânea) e após duas semanas da imunização receberam ovoalbumina e também HSA separadamente (s.c.). A supressão da resposta de

hipersensibilidade tipo IV foi detectada em todos os animais, associada com a diminuição da IgG anti-OVA, sendo também detectada uma supressão simultânea dos níveis de anticorpos anti-HSA nos animais adultos. Outro achado interessante foi apresentado no trabalho de Karlsson *et al.* (2000), no qual a transferência de soro de ratos alimentados com ovoalbumina levou à tolerância específica e à supressão cruzada em animais receptores que foram imunizados com a mistura de ovoalbumina e HSA (s.c.) e desafiados com ovoalbumina e HSA separadamente (s.c.). A resposta de hipersensibilidade tipo IV e dos níveis de IgG anti-OVA e anti-HSA foram mais baixos nos animais que receberam o soro dos doadores alimentados com ovoalbumina, comparativamente aos animais controles. Corroboram com estes resultados o estudo de Oliveira *et al.* (2005) que constataram supressão cruzada em camundongos que receberam ovoalbumina oral antes da imunização com ovoalbumina e ácaro (*Blomia tropicalis*). Neste estudo houve diminuição de IgE para ambos os alérgenos.

Muitos experimentos também evidenciaram que o mecanismo da tolerância imunológica não estava apenas limitado à dose do antígeno administrado por via oral, mas que haveria um efeito da idade nessa resposta (Heppell e Kilshaw, 1982; Faria *et al.*, 1993; Lundin *et al.*, 1996; Verdolin *et al.*, 2001; Fujihashi e McGhee, 2004). Nesse sentido, os autores observaram que animais mais jovens foram mais suscetíveis à indução de tolerância oral (Faria *et al.*, 1993; Lundin *et al.*, 1996; Fujihashi e McGhee, 2004). Outros fatores também devem ser considerados, como a linhagem do animal, o intervalo e a frequência da

exposição por via oral, o tempo entre a alimentação e a imunização e adjuvantes na mucosa (Faria e Weiner, 1999; Faria e Weiner, 2005; Keller *et al.*, 2006).

Embora seja bem documentado que a alimentação com antígeno ocasiona modulação da resposta imune humoral, os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos (Faria e Weiner, 2005). Sabe-se, entretanto, que a tolerância das células B ocorre pela falha dos linfócitos T auxiliares em fornecer as interações necessárias para sua diferenciação e produção de anticorpos (Garside *et al.*, 2004). Com base nesta teoria, Smith *et al.* (2002), utilizando um sistema de transferência adotiva de células B transgênicas (tg) para a ovoalbumina, demonstraram que as células T de animais submetidos à tolerância oral foram incapazes de estimular adequadamente a expansão clonal das células B tg e, conseqüentemente, sua produção de anticorpos. Neste estudo foi observado que no grupo sensibilizado houve um aumento no número de células B tg nos nódulos linfáticos periféricos depois do desafio, contrariamente a um pequeno aumento das células B tg no grupo submetido à tolerância. Isso sugere a hipótese de que a atenuação da resposta das células B ocorreu pela falta de estímulo das células T de animais previamente submetidos à tolerância.

Discutiremos a seguir os principais mecanismos envolvidos no processo de tolerância oral: supressão celular ativa, deleção clonal e anergia.

1.5.3.1. SUPRESSÃO CELULAR ATIVA

A tolerância oral pode ser alcançada por meio de um mecanismo de supressão ativa de uma subpopulação de linfócitos induzida por uma outra subpopulação de linfócitos supressores. Vários estudos têm sido desenvolvidos para avaliar o papel das células com atividade supressora e determinar seu papel na modulação da tolerância oral (Zhang *et al.*, 2001; Hauet-Broere *et al.*, 2003; Kelsall e Leon, 2005; Zu *et al.*, 2006).

As células T reguladoras CD4⁺ servem para limitar respostas inflamatórias e promovem tolerância imunológica, sendo divididas em duas classes, como as células T reguladoras naturais (n Treg) e as células T reguladoras adaptativas (a Treg), que previnem as respostas imunes contra auto-antígenos e as respostas adaptativas imunes, respectivamente. As células a Treg são ainda subdivididas em Treg tipo 1 (Tr1) e tipo 3 (Th3,) que modulam a supressão celular via IL-10 e TGF- β , respectivamente (van Oosterhout e Bloksma, 2005).

Alguns autores sugerem que as células T reguladoras expressam uma proteína transmembrana chamada CD25⁺ (célula T CD4⁺CD25⁺, que representam 5 a 10% do total de células T CD4⁺ periféricas, cujo marcador genético é o fator repressor de transcrição Foxp3), são geradas no timo e encontradas no sangue e em tecidos linfóides periféricos e apresentam uma função importante na supressão de uma ampla série de processos imunes de mediação celular, promovendo a manutenção de tolerância imunológica periférica

(Zhang *et al.*, 2001; Hauet-Broere *et al.*, 2003). Foi recentemente demonstrado que as células regulatórias CD4+CD25+ não funcionam adequadamente em pacientes atópicos, e esse mecanismo pode ser de importância na fisiopatogenia da asma brônquica (Zu *et al.*, 2006). Esses autores observaram que a porcentagem de células T reguladoras CD4+CD25+ foi significativamente mais baixa em crianças asmáticas (6,51%), em comparação com as crianças controles (11,96%).

Zhang *et al.* (2001) demonstraram que a administração por via oral de ovoalbumina em camundongos transgênicos com TCR (receptor de célula T) específico para ovoalbumina causou um aumento de célula T CD4+CD25+ , o qual persistiu por um período de quatro semanas. Além disso, houve aumento na expressão do co-estimulador CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito citotóxico) nas células T CD4+CD25+ em animais alimentados com ovoalbumina.

A diferenciação das células T reguladoras ocorre nas placas de Peyer e nos nódulos linfáticos mesentéricos, no período de até dois dias após a ingestão do antígeno. Ocorre assim a geração de células T antígeno-específica CD25+ e CD25- (Hauet-Broere *et al.*, 2003).

É importante enfatizar que não há consenso sobre todas as possíveis funções dessas células reguladoras. Resumindo, as células Th3 exercem sua função supressora produzindo TGF- β ; as células Tr1 produzindo principalmente IL-10; as células CD4+CD25+ possivelmente estão envolvidas com a produção de citocinas como a IL-10 e TGF- β e com os mecanismos dependentes de contato

celular tal como CTLA-4 (Mowat *et al.*, 2004; Faria e Weiner, 2005; Dubois *et al.*, 2005).

O mecanismo da supressão celular ativa na tolerância oral também envolve a ação das células reguladoras Th2 produtoras de IL-4 e IL10. Essas células estão associadas com a supressão da produção de IL-2 e IFN- γ (interferon gama) pelas células Th1. Tal fato tem sido associado ao controle sintomático de várias doenças auto-imunes (Faria e Weiner, 2005).

A produção do IFN- γ parece estar envolvida nos mecanismos de tolerância (Faria e Weiner, 2005). Turcanu *et al.* (2003) demonstraram que foi possível induzir tolerância oral em crianças alérgicas ao amendoim. Nessas crianças submetidas à tolerância foi observado que os linfócitos produziam altos níveis de IFN- γ e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e baixos níveis de citocinas Th2. Contrariamente, as crianças alérgicas não submetidas à tolerância apresentaram altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 e baixos níveis de IFN- γ e TNF- α . Desse modo, ao ser induzida a tolerância oral ocorreria um desvio imunológico do padrão de resposta Th2 para Th1.

A indução de tolerância imunológica parece envolver também a ativação das células T $\gamma\delta$ (Faria e Weiner, 2005). Para avaliar a função dessas células, Fujihashi *et al.* (1999) induziram tolerância oral em camundongos com deficiência ou não do receptor de célula T $\gamma\delta$. Os animais receberam altas ou baixas doses de ovoalbumina por via oral e foram imunizados com ovoalbumina por via intraperitoneal ou subcutânea, respectivamente. Os autores demonstraram que

em todos os animais houve redução dos níveis séricos de IgE e IgG antígeno-específico, enquanto a redução de IgA foi observada somente nos animais com deficiência de receptor de célula $T\gamma\delta$. Além disso, a tolerância oral induzida com baixas doses de ovoalbumina por via oral foi associada com altos níveis de IL-10 somente nos camundongos que expressavam o receptor de célula $T\gamma\delta$. Tais achados indicaram que as células $T\gamma\delta$ têm maior importância na modulação da resposta de tolerância oral quando são utilizadas baixas doses de antígeno por via oral.

1.5.3.2. DELEÇÃO CLONAL E ANERGIA

Ao mesmo tempo que alguns autores enfatizam a supressão como mecanismo de tolerância oral, outros pesquisadores sugerem que a deleção ou anergia clonal tenham também um papel fundamental (Chen *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003).

Os mecanismos pelos quais as células T entram em apoptose não são totalmente conhecidos, mas estão relacionados com as administrações de antígenos por via oral em altas doses (Faria e Weiner, 1999; Rizzo *et al.*, 1999; Czerkinsky *et al.*, 1999; Garside *et al.*, 2004; Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005). Sua importância como mecanismo modulador das respostas de indução de tolerância oral foi demonstrada no estudo de Chen *et al.* (1995). Os autores administraram altas doses de ovoalbumina por via oral e observaram que houve aumento da apoptose de linfócitos T CD4⁺ nas placas de Peyer em camundongos transgênicos para genes de receptor específico para ovoalbumina nos linfócitos T. Corroborando estes achados, Marth *et al.* (1998), em experimentos com camundongos transgênicos para o receptor de ovoalbumina de células T, demonstraram que a alimentação com altas doses de ovoalbumina levou a um aumento da apoptose de linfócitos, o que foi detectado pela técnica de TUNEL (marcador do entalhe do terminal dUTP). O número de células apoptóticas foi ainda maior quando se associou o tratamento sistêmico com anti-IL-12. Os

autores sugerem que o mecanismo provável de indução de apoptose seja mediado pela ativação de fas-ligante.

É possível ainda que a deleção clonal das células T nas mucosas cause liberação de TGF- β pelas próprias células em apoptose. Esta liberação poderia estimular a fagocitose dos corpos apoptóticos pelos macrófagos e células dendríticas. Esse processo pode ainda contribuir para a proliferação de células T reguladoras, visto que o TGF- β pode atuar como um fator de crescimento para os linfócitos Th3 e para as células reguladoras CD4+Foxp3 (Faria e Weiner, 1999; Faria e Weiner, 2005).

A anergia clonal corresponde a um estado de não-resposta pelos linfócitos T, caracterizado por ausência de proliferação e produção de IL-2 (Friedman, 1996; Faria e Weiner, 1999; Faria e Weiner, 2005). Considera-se que as células T anérgicas poderiam afetar a sinalização das células apresentadoras de antígeno, inibindo dessa maneira a ativação de outras células T e contribuindo para o estabelecimento de um estado anérgico (Faria e Weiner, 1999).

Os mecanismos da anergia clonal não estão plenamente esclarecidos. Entretanto, assim como o mecanismo de deleção clonal, a anergia também ocorre quando são administradas altas doses de antígeno por via oral (Faria e Weiner, 1999; Rizzo *et al.*, 1999; Czerkinsky *et al.*, 1999; Garside *et al.*, 2004; Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005) e parece estar relacionada com alterações na expressão de moléculas de superfície das células apresentadoras de antígenos, o

que modifica a interação do antígeno com os linfócitos T (Faria e Weiner, 1999; Mowat *et al.*, 2004).

A ativação de linfócitos depende da interação do receptor de célula T com o complexo de histocompatibilidade (MHC) e dos sinais co-estimuladores fornecidos pelas células apresentadoras de antígeno (Ragazzo *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2005). A co-estimulação pode ocorrer pela ligação de diversas proteínas da superfície das células apresentadoras de antígenos com diferentes proteínas dos linfócitos T, tais como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) e LFA1 (antígeno associado a leucócitos), B7 e CD28/CTLA4 (a CTLA4 é uma molécula que limita a ativação das células T e é homóloga da CD28, competindo pela ligação com a B7.1 e B7.2) e outros (Ragazzo *et al.*, 2001). Futata *et al.* (2006) demonstraram que, em camundongos, a administração por via oral de ovoalbumina antes da imunização diminuiu a expressão de moléculas co-estimuladoras B7.2 nas células B.

1.5.4. MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA

A indução de tolerância oral tem sido estudada para vários antígenos, em diversas espécies animais, com diferentes doses, usando administrações por via oral que precedem ou sucedem o desafio imunológico sistêmico.

Extensa documentação em doenças auto-imunes e alérgicas, tanto em estudos clínicos como experimentais, demonstrou o sucesso dos estudos de tolerância oral (Russo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Zemmann *et al.*, 2003; Ergun-Longmire *et al.*, 2004; Weiner, 2004; Faria e Weiner, 2005; Keller *et al.*, 2006). Em modelos animais, a indução de tolerância depende de vários fatores que foram apresentados, tais como a concentração, a frequência e a idade dos animais utilizados.

Para investigar os efeitos da tolerância oral na inflamação alérgica, Rodrigues *et al.* (2006) utilizaram um modelo de peritonite em camundongos. Os animais submetidos à tolerância oral receberam ovoalbumina, *ad libitum*, durante três dias consecutivos e foram imunizados com ovoalbumina por via s.c., (sete e quatorze dias após o tratamento com ovoalbumina por via oral) e desafiados sete dias após com ovoalbumina por via intraperitoneal. Os animais submetidos à tolerância oral apresentaram redução de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos na cavidade peritoneal, de neutrófilos e eosinófilos no sangue e de eosinófilos na medula óssea comparados com os animais controles. Os autores demonstraram que a tolerância oral possui um efeito específico local e um efeito sistêmico.

Keller *et al.* (2006) utilizaram um modelo de asma em camundongos e investigaram os efeitos da administração por via oral ou via nasal de ovoalbumina (antes, durante ou após a imunização) no desenvolvimento da resposta imune celular e humoral. Os resultados revelaram que a administração por via oral ou nasal de ovoalbumina antes da imunização reduziu a eosinofilia pulmonar, a hiper-reatividade das vias aéreas, as citocinas Th2 e os anticorpos anafiláticos

IgE. Entretanto, a diminuição dos anticorpos IgG₁ foi observada somente na administração por via oral. Os autores sugerem que tal fato pode ser explicado pela ação das células dendríticas nas células T reguladoras, as quais exerceriam seus efeitos via produção de TGF- β . A ovoalbumina administrada no primeiro dia de imunização (dia zero) inibiu a resposta alérgica Th2, mas não inibiu os anticorpos IgG₁. Finalizando, a administração de ovoalbumina após a imunização inibiu somente a resposta inflamatória pulmonar.

Futata *et al.* (2006) investigaram a durabilidade do efeito tolerogênico em camundongos alimentados com ovoalbumina sob diferentes regimes. Foi observado nos camundongos alimentados com ovoalbumina sete dias antes da imunização por via intraperitoneal (i.p.) ou no regime de alimentação sete dias antes e até três dias depois da imunização, uma supressão longa e duradoura da resposta de IgE, IgG₁ e IgG_{2a} até oito meses da imunização. A inibição na produção de anticorpos foi associada a uma inibição na expressão de B7.2 nas células B. Os animais alimentados com OVA somente após a imunização, apresentaram inibição transitória de IgE.

A imunoterapia com alérgeno por via oral também foi avaliada em cachorro da raça *beagles*, considerado como atópico, por Zemann *et al.* (2003). Nesse modelo, os animais foram imunizados por via s.c. com pólen recombinante (*Phleum pratense*) imediatamente após o nascimento e repetido na segunda, quarta e sexta semanas. Em seguida, a tolerância oral foi induzida com ovoalbumina dissolvida no leite de vaca e administrada durante quatro semanas. Ao final da indução da tolerância, os cachorros receberam quatro doses de

imunização s.c. com o pólen e a ovoalbumina. O desafio foi realizado com a ovoalbumina por via ocular e inalatória. Nesse modelo foi possível não só suprimir a resposta de IgE e IgG específica para a ovoalbumina como também atenuar outros parâmetros clínicos de alergia como a hiper-responsividade brônquica, a inflamação neutrofílica e eosinofílica pulmonar e a conjuntivite. Foi também possível demonstrar uma ligação entre a supressão dos sintomas alérgicos e a presença de altos níveis de IL-10 e TGF- β no lavado broncoalveolar.

Chung *et al.* (2002) examinaram os efeitos preventivos e terapêuticos da administração por via oral de altas doses de alérgeno em modelo de inflamação alérgica leve e grave em camundongos. Seus resultados revelaram que a indução de tolerância oral precedida da imunização diminuiu a hiper-reatividade das vias aéreas, a produção de IgE alérgeno-específica, citocinas de padrão Th2, diminuição de eosinófilos no lavado broncoalveolar e diminuição do infiltrado inflamatório no pulmão. A indução de tolerância oral após a imunização também aboliu todas essas respostas somente no modelo experimental de asma leve.

Russo *et al.* (2001) estudaram tolerância oral em modelo de asma experimental em várias linhagens de camundongos, a saber: BALB/c, BP2, CBA/Ca transgênico para IL-5 e BALB/c deficiente em receptor δ para células T. A tolerância oral foi induzida com administrações de ovoalbumina a 1% durante cinco dias antes da imunização. Os autores observaram que houve diminuição da resposta inflamatória em vias aéreas em todas as linhagens testadas, incluindo a de camundongos deficientes em receptores $\gamma\delta$. Houve diminuição acentuada da inflamação eosinofílica, da produção de muco, baixos níveis de citocinas Th2 no

lavado broncoalveolar e diminuição de IgG₁ e IgE. Contrariamente ao trabalho de Zemmann *et al.* (2003), não ocorreu aumento de IL-10 e TGF- β ou desvio para a via imune de Th1 devido ao não aumento dos níveis de INF- γ e IL-12. Portanto, seus resultados favorecem a hipótese da deleção clonal e anergia.

Kato *et al.* (2001) estudaram a resposta imune sistêmica e de mucosa em camundongos submetidos à tolerância oral com altas doses de ovoalbumina e imunizados por via oral com uma mistura de ovoalbumina e toxina da cólera como adjuvante. Os camundongos que receberam ovoalbumina por via oral apresentaram redução de IgA anti-OVA e de IgG anti-OVA no soro associadas com diminuição de IgA anti-OVA na mucosa intestinal, da hipersensibilidade tipo V e do perfil de citocinas Th2 no baço e na Placa de Peyer, comparados com os animais controles. O uso da toxina da cólera como adjuvante não interferiu nessa resposta.

Maciel *et al.* (2000) observaram diminuição dos níveis de IgE total e específica, com redução de IFN- γ e IL-5 e concomitante aumento de TGF- β nos tecidos linfóides associados à mucosa, após a alimentação com *Dermatophagoides pteronyssinus* em camundongos previamente sensibilizados. Os camundongos foram sensibilizados com doses por via subcutânea e intramuscular e receberam um reforço por via intraperitoneal nos dias 21 e 28, sendo que a administração intragástrica do antígeno foi realizada nos dias 6, 7 e 8 após o início da sensibilização. O *Dermatophagoides pteronyssinus* é um dos ácaros que mais freqüentemente desencadeiam reações alérgicas, sugerindo

assim que a tolerância oral pode ser uma estratégia promissora em doenças alérgicas.

Rizzo *et al.* (1999) investigaram a importância da IL-4 e IL-10 na capacidade de induzir tolerância oral em modelo de uveíte auto-imune experimental em camundongos. Os autores utilizaram camundongos deficientes de IL-4, IL-10 e ambos. Seus resultados revelaram que a IL-4 e a IL-10 não interferiram na capacidade de induzir a uveíte auto-imune experimental, entretanto, foram importantes para induzir a tolerância protetora. Nesse experimento, quando os animais deficientes foram alimentados com o antígeno com maior frequência, a uveíte auto-imune experimental não ocorreu nos animais com deficiência de IL-4 e IL-10, demonstrando ser, nesse caso, citocina-independentes. Seus resultados sugerem que o mecanismo de supressão celular ou anergia e a deleção clonal foram predominantes nos regimes com baixas e altas doses, respectivamente.

Considerando que a hiper-reatividade brônquica na asma está correlacionada com padrão eosinofílico e infiltrado de células Th2 nas vias aéreas, Russo *et al.* (1998) investigaram o efeito da tolerância oral em modelo experimental de asma em camundongos. Os animais receberam ovoalbumina a 2%, *ad libitum*, durante cinco dias consecutivos e imunizados dois dias após com fragmentos de clara de ovo no subcutâneo ou com ovoalbumina por via i.p. e desafiados 14 dias após com ovoalbumina por via inalatória. O modelo de asma com fragmentos de clara de ovo no subcutâneo demonstrou maior aumento de eosinófilos na medula óssea e pulmão e, portanto, foi utilizado para estudar o efeito da tolerância oral. O estudo demonstrou, por meio de análise da atividade peroxidase para eosinófilos, que a

tolerância oral foi efetiva na prevenção do aumento de eosinófilos na medula óssea e no pulmão. A análise histopatológica do estudo confirmou ausência de infiltrado eosinofílico peribrônquico e perivascular nos animais submetidos à tolerância oral. Torna-se claro neste estudo que a tolerância oral foi eficiente na inibição da resposta alérgica Th2.

Do exposto, fica claro que o mecanismo de indução de tolerância não está totalmente esclarecido e depende da interação de múltiplos fatores. No entanto, as evidências provenientes dos estudos em modelos experimentais e humanos indicam que a tolerância oral é um caminho promissor para o tratamento de diversas doenças, incluindo a asma. Com base nos resultados descritos acima, conclui-se que, embora diversos estudos apontem para a importância da tolerância oral na inibição da resposta asmática, não foram encontrados trabalhos que avaliassem seus efeitos em modelo experimental de inflamação alérgica crônica pulmonar, no qual fossem analisados não somente seus efeitos terapêuticos e preventivos no controle da hiper-responsividade e resposta inflamatória pulmonar, mas também seu papel no remodelamento das vias aéreas. Além disso, não encontramos na literatura estudos que avaliassem o papel do óxido nítrico em modelos de indução de tolerância oral.

2

OBJETIVOS

Desse modo, nossos objetivos neste estudo foram:

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver dois métodos de indução de tolerância oral em um modelo experimental de inflamação alérgica crônica pulmonar em cobaias. A estratégia básica utilizada para o desenvolvimento destes dois modelos pretende compreender os efeitos da indução de tolerância oral, tanto como uma abordagem preventiva como terapêutica, na modulação da resposta inflamatória crônica neste modelo experimental.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para caracterizar estes dois modelos de indução de tolerância oral, foram analisados os seguintes aspectos:

1. Resposta de mecânica do sistema respiratório
2. Resposta da hiper-responsividade brônquica à metacolina
3. Avaliação do óxido nítrico exalado
4. Formação de anticorpos anafiláticos
5. Avaliação da resposta inflamatória brônquica
6. Avaliação da eosinofiloiose
7. Avaliação da expressão da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase nas células epiteliais brônquicas
8. Avaliação na parede brônquica dos seguintes componentes da matriz extracelular: fibras colágenas e elásticas

3

***MATERIAL E
MÉTODOS***

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (CAPPesq: 365/02). Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidado e uso de animais de laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985), sendo que todos os procedimentos foram realizados com os animais sob efeito de anestesia geral.

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas cobaias do sexo masculino, da linhagem Hartley, provenientes da empresa MEDLAB Produtos e Diagnósticos Ltda. (São Paulo, Brasil). Os animais foram mantidos, durante todo o período do experimento, no Biotério de Manutenção conjunto com os Laboratórios de Investigação Médica (LIM) 05, 20 e 65 desta Faculdade, recebendo alimento e água, *ad libitum*, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído. Os animais foram retirados do biotério somente para exposição ao antígeno inalatório e o experimento final.

O peso médio corporal foi de 300-350 g e a idade de aproximadamente três semanas no momento de iniciar o protocolo de sensibilização inalatória.

Foram submetidas ao protocolo de sensibilização 94 cobaias, sendo que durante esse período ocorreram sete perdas. Após a sétima inalação, 37 foram submetidas à avaliação da mecânica pulmonar com cinco perdas durante esse procedimento; 36 animais, à avaliação da curva dose-resposta à metacolina com quatro perdas; e 14 cobaias foram utilizadas para avaliação dos títulos de anticorpos IgG₁ por meio da anafilaxia cutânea passiva.

3.2. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

As cobaias foram colocadas, uma a uma, em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultra-sônico (Sonicler, São Paulo, Brasil) e submetidas a repetidas inalações de um aerossol de ovoalbumina grau V (OVA) (Sigma Chemical Corporation, St Lous, MO, EUA) diluída em NaCl a 0,9% (soro fisiológico) (Baxter, Brasil). O aerossol foi produzido por um inalador ultra-sônico, sendo que as partículas geradas apresentavam um diâmetro que variou de 0,5 a 10 µm, sendo a taxa de nebulização de 1ml/min.

As inalações tinham duração de 15 minutos ou até que ocorresse desconforto respiratório, sendo que neste momento as cobaias eram imediatamente retiradas da caixa de exposição. O tempo em que os animais permaneceram em contato com o aerossol foi cronometrado e denominado de

tempo de inalação. Foi considerado desconforto respiratório o aparecimento de tiragem intercostal, tosse ou coriza intensa e/ou cianose.

O protocolo de inalação foi repetido duas vezes por semana durante um período de quatro semanas, sendo que durante este período foram utilizadas concentrações crescentes de solução de ovoalbumina para evitar a ocorrência de tolerância inalatória, como foi previamente descrito (Paré *et al.*, 1979; Sedgwick e Holt, 1985). Ao todo foram sete inalações, sendo que nas quatro primeiras inalações a dose utilizada foi 1 mg/ml, na quinta e na sexta inalações utilizou-se a concentração de 2,5 mg/ml e na última inalação a concentração de antígeno inalatório foi de 5 mg/ml. Os animais controle foram submetidos ao mesmo protocolo, utilizando-se para inalação soro fisiológico a 0,9% (FIGURA 5).

3.3. MÉTODO DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA

A indução da tolerância foi realizada pela administração por via oral de ovoalbumina liofilizada pura a 2% (Advanced Nutrition Ltda., Brasil) dissolvida em água estéril e oferecida *ad libitum*. As cobaias submetidas à tolerância oral foram divididas em dois grupos: grupo tolerância 1 (TO1) e grupo tolerância 2 (TO2). O primeiro recebeu solução de OVA a 2% a partir da primeira inalação e o segundo a partir da quarta inalação, momento no qual os animais já apresentavam titulações de anticorpos IgG₁ de até 1/320. Ambos receberam a solução OVA a

2% diariamente até completar a última inalação. A FIGURA 5 representa um cronograma do protocolo de tolerância oral dos dois grupos estudados.

3.4. DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estudados quatro grupos experimentais (FIGURA 6), sendo que as cobaias receberam, respectivamente:

- a) Inalações com soro fisiológico e água *ad libitum* durante quatro semanas (grupo SAL, n = 16);
- b) Inalações com solução de ovoalbumina e água *ad libitum* durante quatro semanas (grupo OVA, n = 16);
- c) Inalações com solução de ovoalbumina e solução de ovoalbumina a 2% *ad libitum* durante quatro semanas (grupo TO1, n = 16);
- d) Inalações com solução de ovoalbumina e solução de ovoalbumina a 2% *ad libitum* a partir da quarta inalação durante duas semanas (grupo TO2, n = 16).

Após quatro semanas os animais foram submetidos ao protocolo de avaliação da mecânica pulmonar ou da curva dose-resposta à metacolina.

FIGURA 5: Esquema do protocolo de sensibilização e determinação dos dois grupos de tolerância. As cobaias foram submetidas às inalações com ovoalbumina em doses crescentes ou soro fisiológico (NaCl a 0,9%). O grupo TO1 iniciou o protocolo de sensibilização e tolerância concomitantemente, recebendo ovoalbumina oral a 2% *ad libitum* a partir da primeira inalação, e o grupo TO2 iniciou o protocolo de tolerância oral a partir da quarta inalação, quando já apresentavam títulos de anticorpos IgG₁ de 1/320. A avaliação da mecânica pulmonar ou da curva dose-resposta à metacolina foi realizada 72 horas após a última inalação.

FIGURA 6: Esquema de determinação dos grupos experimentais. Animais controle: cobaias inaladas com ovoalbumina ou soro fisiológico e que tomaram água estéril (grupo OVA e SAL, respectivamente). Animais tolerantes: cobaias inaladas com ovoalbumina e que receberam ovoalbumina por via oral a partir da primeira inalação (grupo TO1) ou a partir da quarta inalação (grupo TO2).

3.5. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO EXALADO (NO_{EX})

Após 72 horas da última inalação, oito animais de cada grupo foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg, i.p.), traqueostomizados e submetidos à ventilação mecânica. Uma cânula de polietileno, de diâmetro interno de 0,17 mm, foi introduzida na traquéia e, por sua outra extremidade, ligada a um ventilador para pequenos animais (Harvard 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) ajustado para uma frequência de 60 ciclos por minuto e um volume corrente de 8 ml/kg, em ar ambiente. A cânula foi fixada por fio de algodão, o que impedia a perda de volume corrente por vazamento entre a sonda e a parede traqueal. A cânula traqueal foi aspirada no início do experimento e sempre que se notasse excesso de secreção.

O gás foi coletado na porção expiratória do ventilador através de um balão impermeável ao óxido nítrico (Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, EUA), com capacidade volumétrica de 1,5 litro, próprio para este tipo de coleta, durante 5 minutos (protocolo adaptado de Mehta *et al.*, 1997). Esse procedimento já foi padronizado em nosso laboratório (Leick-Maldonado *et al.*, 2004). Na porção inspiratória do ventilador, foi conectado um filtro para reduzir, no ar que entra, a concentração de óxido nítrico (NO) a zero. Foi coletada uma amostra imediatamente após os animais terem sido conectados ao ventilador mecânico e

estarem estabilizados. Após o término do período de coleta, os balões foram selados para posterior análise.

O óxido nítrico foi mensurado por quimioluminescência por meio de um analisador de resposta rápida (280 NOA - Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO). A concentração média de óxido nítrico foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice da concentração de óxido nítrico no ar exalado. O analisador de óxido nítrico foi calibrado utilizando-se dispositivo que filtra o óxido nítrico presente no ar ambiente e gás de referência com uma concentração de óxido nítrico conhecida (mistura padrão para calibração de óxido nítrico em N₂ a 45 ppb, White Martins Gases Industriais, São Paulo, SP, Brasil).

Após a coleta do balão de óxido nítrico exalado, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica do sistema respiratório.

3.6. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR

Estando o animal traqueostomizado e ventilado como descrito acima, ao final da coleta do NO_{ex} foram realizadas as medidas da mecânica pulmonar obtendo-se os valores basais e após a broncoprovocação com ovoalbumina ou soro fisiológico. A FIGURA 7 demonstra um esquema da avaliação dos valores de

resistência do sistema respiratório (R_{rs}) e a elastância do sistema respiratório (E_{rs}).

As medidas de pressão traqueal (P_{tr}) foram feitas a partir da conexão a um transdutor diferencial de pressão (Honeywell 142PC05D, Freeport, EUA). As medidas de fluxo (V') foram obtidas por um pneumotacógrafo (Fleish 4-0, Richmond, EUA) conectado à cânula traqueal e a um transdutor diferencial de pressão (Honeywell 142PC05D, Freeport, EUA). O pneumotacógrafo foi construído de acordo com o recomendado por Mortola e Noworaj (1983) e também bastante utilizado em nosso laboratório (Tibério *et al.*, 1997; Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005a, Prado *et al.*, 2005b). Os valores de volume pulmonar (V) foram obtidos por meio da integração do sinal de fluxo, com o auxílio de um microcomputador (FIGURA 7).

Os sinais de P_{tr} , V' e V foram obtidos com o uso de um conversor analógico digital de 12 bits (DT2801A, data translation), a uma frequência de 200 Hz, armazenados em um microcomputador. Cada valor de volume e fluxo obtidos representava a média de 8 a 9 ciclos respiratórios.

Os três parâmetros foram obtidos no tempo zero (valor basal), imediatamente após o desafio por 1 minuto com solução de ovoalbumina (30 mg/ml), após a segunda inalação por 1 minuto com solução de ovoalbumina (30mg/ml) e no tempo subsequente de 5 minutos. Os animais controle foram inalados com soro fisiológico e as medidas de mecânica pulmonar obtidas nos mesmos momentos acima citados. Warth *et al.* (1995) testaram previamente os

efeitos da provocação pulmonar com aerossol de ovoalbumina por via inalatória em doses crescentes e determinaram que a concentração de 30 mg/ml desencadeava a resposta máxima do aumento de resistência pulmonar total e da elastância pulmonar dinâmica.

Para o cálculo da elastância total do sistema respiratório (E_{rs}) e da resistência do sistema respiratório (R_{rs}), utilizou-se a equação do movimento do sistema respiratório:

$$P_{tr}(t) = E_{rs} \cdot V(t) + R_{rs} \cdot V'(t), \text{ onde:}$$

P_{tr} é a pressão traqueal; V , o volume; V' , o fluxo; e t corresponde ao tempo. Foram obtidos os valores basais (tempo zero) e a resposta máxima. Foi então calculada a porcentagem do aumento máximo de resistência e de elastância do sistema respiratório após inalação com ovoalbumina ou soro fisiológico.

Ainda sob efeito anestésico, os animais foram submetidos à laparotomia e receberam 0,2 ml de heparina sódica (5000 UI/ml, Roche, São Paulo, Brasil) na veia cava inferior. Em seguida, foi realizada toracotomia e os animais foram sacrificados por exsanguinação (secção da aorta abdominal). Após a exsanguinação, foi imediatamente aplicada uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cm H₂O na porção expiratória do respirador para evitar colapso alveolar devido à abertura da caixa torácica. A traquéia foi ocluída ao final da expiração, de modo a manter o volume pulmonar próximo à capacidade residual funcional. Os pulmões e o coração foram retirados rapidamente em monobloco,

sendo que um dos pulmões de cada animal foi utilizado para os estudos morfométrico, histopatológico e imunoistoquímico e o outro pulmão foi utilizado no estudo histoquímico utilizando a coloração para a atividade da peroxidase eosinofílica (cianeto-resistente).

3.7. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DA CURVA DOSE-RESPOSTA À METACOLINA

Nessa fase foram utilizados oito animais de cada grupo, como descrito acima. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.), colocados na posição supina e ventilados mecanicamente como no estudo de mecânica pulmonar (FIGURA 7).

A veia jugular direita foi dissecada e um catéter de polietileno com diâmetro de 1,1 mm foi introduzido. Através deste catéter foram administradas doses crescentes de metacolina (cloreto de metacolina, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MI, USA) diluídas em solução salina, em concentrações de 0,1 a 10.000 µg/kg de peso do animal, com intervalo de 3 minutos após cada dose. Os sinais de fluxo e a pressão traqueal foram coletados na situação basal, após a administração de 1 ml/kg de soro fisiológico a 0,9% e quando era observado o aumento máximo de Ptr após cada dose de metacolina por via intravenosa administrada (Arantes-Costa *et al.*, 2002). Dessa maneira, foi construída a curva

dose-resposta à metacolina nos valores de Rrs e Ers comparando a reatividade (desvio da curva para cima) e a sensibilidade (desvio da curva para a esquerda) entre os grupos.

FIGURA 7: Arranjo experimental para avaliação da mecânica pulmonar e da curva dose-resposta à metacolina. Os animais foram ventilados mecanicamente no respirador Harvard 883 e após a estabilização do animal foi coletado o NO_{ex} . As medidas de P_{tr} , V' e V foram obtidas por meio do pneumotacógrafo e do transdutor diferencial de pressão e enviados ao microcomputador. Os valores de Rrs e Ers foram obtidos pela da equação do movimento do sistema respiratório. Após a coleta do NO_{ex} , foram feitos os registros basais e em 1, 2 e 5 minutos após a broncoprovocação com ovoalbumina (30 mg/ml) ou inalação com soro fisiológico. Para os animais submetidos à avaliação da curva dose-resposta à metacolina, os valores de Rrs e Ers foram obtidos após cada dose de metacolina i.v. administrada.

3.8. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Após a retirada dos pulmões e coração em monobloco, um dos pulmões foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% em quantidade suficiente para a imersão total do pulmão por 24 horas. Após esse período, o pulmão foi então transferido para uma solução de etanol a 70%. Depois de terminada a fixação, o material foi submetido a técnicas histológicas habituais com parafina, para a obtenção de cortes de 5 μm de espessura, e corado com hematoxilina e eosina. O tecido a ser estudado foi retirado das regiões periféricas dos pulmões.

Para o estudo morfométrico foi utilizado um microscópio óptico comum (CH30, Olympus, Japão).

ÍNDICE DE EDEMA PERIBRÔNQUICO

Foi medida a quantidade de edema peribrônquico em vias aéreas não cartilaginosas cortadas transversalmente, utilizando-se a técnica de contagem de pontos (Weibel, 1963) com o auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas sobreposto ao tecido ($10^4 \mu\text{m}^2$ de área total). Vários autores já demonstraram que esse método é adequado para a quantificação desse índice (Garcia *et al.*, 1994;

Sakae *et al.*, 1995; Warth *et al.*, 1995; Tibério, 1996; Tibério *et al.*, 1997) (FIGURA 8).

Utilizando-se o aumento de 1.000x, foi contado o número de pontos do retículo que coincidia nas áreas de edema peribrônquico das vias aéreas, em três campos selecionados de forma randômica (índice de edema peribrônquico, IE) que não incluíam a região próxima à parede vascular. Foram estudadas três a cinco vias aéreas por lâminas selecionadas, de modo randômico, totalizando de 9 a 15 campos por animal.

3.9. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os mesmos cortes histológicos utilizados para determinar o índice de edema peribrônquico foram também usados para determinar o infiltrado de células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) ao redor das vias aéreas. Com o auxílio de um retículo ($10^4 \mu\text{m}^2$ de área total, foram contadas as células que infiltravam a parede da via aérea, entre o epitélio brônquico e a adventícia, no aumento de 1.000x. Foram analisados 10 a 20 campos por corte e o número de células expresso por unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$) (FIGURA 8).

3.10. ESTUDO HISTOQUÍMICO COM O MÉTODO CIANETO-RESISTENTE PARA PEROXIDASE DE EOSINÓFILOS

Os pulmões foram insuflados por via traqueal com 5 ml de solução “Tissue Freezing Médium” (diluída 2:1 em solução fisiológica a 0,9%). Foram cortados fragmentos de cada pulmão, cobertos com a mesma solução e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C . Os cortes obtidos no criostato (espessura de 3 μm) foram colocados em lâminas previamente cobertas com poli-L-lisina, fixadas em clorofórmio-acetona vol/vol por 10 minutos e submetidas à realização da coloração cianeto-resistente para a peroxidase eosinofílica descrita a seguir.

Os fragmentos foram mantidos durante 10 minutos em contato com solução de Na_2PO_4 (60 mM) e KH_2PO_4 (70 mM) em pH 7,5, KCN, diamino-benzidina e H_2O_2 . Os cortes eram posteriormente contracorados com hematoxilina. As células coradas em marrom-dourado foram denominadas eosinofílicas EPO+ (peroxidase eosinofílica positiva). Esse método é específico para a peroxidase de eosinófilos, não ocorrendo reação cruzada com a peroxidase de neutrófilos. Essa técnica foi descrita previamente e utilizada por diversos autores (Zucker-Franklin e Grusky, 1976; Ten *et al.*, 1989; Lapa e Silva *et al.*, 1993; Tibério, 1996; Tibério *et al.*, 1997). Com o auxílio de um retículo foram contadas as células EPO+ que infiltravam a parede da via aérea, entre o epitélio brônquico e a adventícia, contadas no aumento de 1.000x com a mesma técnica descrita acima. Foram

analisados 10 a 20 campos por corte e o número de células positivas expresso por unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$).

FIGURA 8: Representação esquemática do retículo sobreposto à ocular do microscópio. Cada linha contém cinco retas com dois pontos, sendo um em cada extremidade, e o retículo possui um total de 10 linhas. A área total do retículo é de $10^4 \mu\text{m}^2$. O retículo foi ancorado entre o epitélio e a adventícia e utilizado para avaliação do índice de edema, contagem de células PMN, MN e EPO+ nas vias aéreas não-cartilaginosas dos quatro grupos estudados. nP = número de pontos.

3.11. ANÁLISE DOS EOSINÓFILOS NA MEDULA ÓSSEA

Para o preparo das lâminas, a medula óssea foi retirada pela técnica de *flushing*, na qual, após a fragmentação do fêmur, procurou-se retirar o conteúdo intra-medular em uma única manobra. Com o auxílio de um retículo ($10^4 \mu\text{m}^2$ de área total), foram contados os eosinófilos da medula óssea em lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) no aumento de 1.000x. Foram analisados 10 campos por corte e o número de células expresso por unidade de área.

3.12. ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA (PCA)

A análise semiquantitativa de IgG₁ e IgE específicas para ovoalbumina foi realizada pela técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA, do inglês *Passive Cutaneous Anaphylaxis*) descrita por Ovary (1964)³, modificada por Perini e Mota (1973) e utilizada por Warth (1994).

³ Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis. *Methods Med Res.* 1964;10:158-62. apud Perini A, Mota I. The production of IgE and IgG1 antibodies in guinea pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology.* 1973;25:297-305.

Após sete dias do término do protocolo experimental de inalações, três cobaias de cada um dos quatro grupos experimentais foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) e submetidas a punção cardíaca de 5 ml de sangue. As amostras de sangue foram mantidas a uma temperatura de 4°C. Após a coagulação espontânea, essas foram centrifugadas a 2.000 rpm durante 20 minutos em uma centrífuga refrigerada. Para a estimativa de anticorpos da subclasse IgG₁, alíquotas de soro foram inativadas a 56°C em banho-maria por 1 hora, para inibir a atividade de anticorpos da subclasse IgE. Para a estimativa de anticorpos da classe IgE, as alíquotas de soro não foram aquecidas. A região dorsal de cobaias normais ou animais-teste (não sensibilizadas à ovoalbumina) foi depilada com depilador elétrico, tomando-se os devidos cuidados para não provocar irritação na pele desses animais. Várias injeções intradérmicas de soro diluído em soro fisiológico a 0,9% (desde 1:5 até 1:1600) foram aplicadas em cada lado do dorso com agulha hipodérmica. Injetava-se 0,1 ml de cada diluição do soro a ser testado, cada amostra sendo injetada em três cobaias normais. Após aguardar 24 horas de sensibilização para a pesquisa de anticorpos igG₁ e 10 dias para a pesquisa de anticorpos IgE, tempo necessário para a certeza da fixação destas reaginas ao tecido, os animais-teste foram provocados por via intravenosa com 1 mg de ovoalbumina em solução de Evans a 0,25%.

Trinta minutos após a injeção do antígeno, os animais foram sacrificados, a pele foi invertida e o diâmetro da lesão foi medido na superfície interna da pele com uma régua transparente. Os anticorpos foram estimados como sendo a maior diluição de soro capaz de induzir uma reação anafilática passiva cutânea. A

titulação de PCA obedeceu à regra de que o maior título correspondia à maior diluição de soro capaz de produzir reação na pele do animal-teste.

3.13. IMUNOISTOQUÍMICA PARA A DETECÇÃO DE nNOS NO EPITÉLIO BRÔNQUICO

A imunoistoquímica foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por Coers *et al.* (1998). Para tanto, os cortes foram incubados (30 minutos em temperatura ambiente) com uma solução bloqueadora contendo soro de camundongo normal (Dako Corp., Carpintria, CA). Em anticorpo monoclonal de camundongo anti-nNOS, a IgG_{2a} (nNOS/NOS Type I - Transduction Laboratories – N31020) foi utilizada como anticorpo primário (incubado *overnight* em temperatura ambiente, diluição 1:150 em tampão TRIS). Após três lavagens em tampão TBS por 5 minutos, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (LSAB+AP Link Universal) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Os cortes foram então lavados três vezes com tampão TBS por 5 minutos e cobertos com fosfatase alcalina pré-diluída (LSAB + AP- Streptavidin AP- Dako Corp., Carpintria, CA) por 30 minutos, seguido de incubação com substrato Fast Red TR (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO), por 6 minutos e submetidos à contracoloração com hematoxilina por 1 minuto.

ANÁLISE DAS CÉLULAS EPITELIAIS BRÔNQUICAS nNOS POSITIVAS POR MEDIDA DE DENSIDADE ÓPTICA

A medida de densidade óptica foi o método empregado para a análise da positividade de nNOS no epitélio brônquico das vias aéreas dos animais estudados. A análise por medida de densidade óptica foi realizada por meio de sistema de análise de imagens composto de microscópio Zeiss Axioplan, com câmara de vídeo acoplada, que enviava as imagens por meio de placa digitalizadora de imagens a um computador. Por meio de um programa (Optimas v.4.10), as imagens foram adquiridas e processadas obtendo-se a medida da área de positividade para nNOS nas lâminas de imunoistoquímica para nNOS. Este programa permitiu que lhe fosse informado os tons das cores que representavam as áreas de positividade e assim pôde-se calculá-las nas regiões do epitélio de interesse previamente delimitadas (FIGURA 9). Os resultados foram expressos em porcentagem de área.

$$\text{Porcentagem de células epiteliais positivas} = (\text{área de células positivas} / \text{área total}) \times 100$$

FIGURA 9: Imunoistoquímica para nNOS e delimitação do epitélio das vias aéreas. A imagem foi adquirida em um aumento de 400x, o epitélio foi inicialmente delimitado e através de um programa de análise da imagem foi informado o tom de cor referente à positividade para nNOS. Os resultados foram expressos em porcentagem de células epiteliais nNOS positivas na área do epitélio.

3.14. ESTUDO DO CONTEÚDO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS PRESENTES NA PAREDE DAS VIAS AÉREAS

COLORAÇÃO DE PICO-SÍRIUS

Utilizou-se a coloração de picro-sírius para evidenciar as fibras colágenas presentes na parede das vias aéreas. Os cortes foram desparafinados e lavados com água e corados por 1 hora no picro-sírius red à temperatura ambiente e posteriormente lavados em água corrente por 5 minutos. Após essa etapa, os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris por 6 minutos e posteriormente lavados novamente em água corrente por 10 minutos. Por fim, montaram-se as lâminas.

COLORAÇÃO DE RESORCINA-FUCSINA

A coloração de resorcina-fucsina permitiu evidenciar a presença das fibras elásticas propriamente ditas e as fibras elastínicas na parede das vias aéreas. Para tanto, os cortes foram desparafinados, hidratados em álcool 95°, posteriormente corados pela resorcina-fucsina por 1 hora e lavados em água

corrente por 5 minutos. Realizaram-se então duas trocas de álcool 70° durante 10 minutos, sendo essa etapa a da diferenciação das fibras. Em seguida foram desidratados, diafanizados e posteriormente montados. A leitura foi realizada no analisador de imagens e os resultados expressos em porcentagem de área de fibras positivas em relação à área da parede da via aérea.

COLORAÇÃO DE RESORCINA-FUCSINA OXIDADA

A coloração de resorcina-fucsina oxidada foi utilizada para a avaliação das fibras elásticas propriamente ditas, elaunínicas e oxitalânicas. Para tanto, os cortes foram desparafinados e hidratados em água. Sobre eles, foi gotejada uma solução aquosa de OXONA a 10% e permaneceram oxidando por 40 minutos. Foram então lavados em água corrente por 5 minutos e, após, submersos no álcool 70° e 95°. Após esse procedimento específico para os cortes oxidados, foram realizados os mesmos procedimentos do item anterior para a coloração de resorcina-fucsina.

**ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS PRESENTES NAS VIAS AÉREAS
UTILIZANDO ANALISADOR DE IMAGENS POR DENSIDADE ÓPTICA**

Esse método permitiu quantificar a porcentagem de fibras colágenas e elásticas propriamente ditas, elastínicas e oxitalânicas. Para a quantificação das fibras colágenas foi acoplado ao microscópio um polarizador. Analisaram-se todas as vias aéreas presentes no corte analisado. A medida de densidade óptica foi o método empregado para a análise da porcentagem de fibras colágenas e elásticas na parede das vias aéreas dos animais estudados. A análise foi realizada por meio de sistema de análise de imagens composto de microscópio Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Alemanha), com câmera de vídeo Sony acoplada, que enviava as imagens por meio de placa digitalizadora de imagens a um computador. Por meio de um *software* (Optimas v.4.10), as imagens foram adquiridas e posteriormente avaliadas pelo analisador de imagens (Image J, NIH). Esse programa de análise de imagens é gratuitamente fornecido pelo site da National Institute of Health e já vem sendo utilizado em nosso laboratório em outros projetos que estudam o processo de remodelamento (Prado, 2004; Prado *et al.*, 2005b). Este *software* permitiu que fosse informado o tom de cor que representa as fibras positivas e assim quantificá-las na área determinada previamente (*threshold*).

Foram analisados de seis a oito vias aéreas por animal, como exemplificado na FIGURA 10. As fibras elásticas e as de colágeno foram expressas em porcentagem na área da parede:

$$\text{Porcentagem de elastica/colágeno na parede da via aérea} = \frac{(\text{área de elastica/colágeno total} - \text{área de elastica/colágeno da luz})}{(\text{área total da via aérea} - \text{área da luz})} \times 100$$

FIGURA 10: Fotomicrografias das vias aéreas exemplificando as medidas realizadas por meio da análise de imagem para avaliar o conteúdo de fibras elásticas e de colágeno na parede da via aérea. A) Diâmetro externo menor B) Diâmetro externo maior C) Diâmetro interno menor D) Diâmetro interno maior E) Espessura superior da via aérea F) Espessura inferior da via aérea G) Espessura lateral esquerda da via aérea H) espessura lateral direita da via aérea I) Área total da via aérea (incluindo adventícia e a luz da via aérea) J) Área da luz da via aérea K) Comprimento da membrana basal L) Área da parede da via aérea (área total menos a área da luz) M) Exemplificando o *threshold* para demarcar as fibras positivas.

3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Stat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA), sendo utilizada a análise de variância (one-way ANOVA). Para os resultados que tiveram distribuição paramétrica, foi utilizado, para as comparações múltiplas, o teste de Student-Newman-Keuls ou o teste de Tukey, sendo esses resultados expressos na forma de média e erro padrão e os gráficos nas formas de barras. Para os resultados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, com os resultados expressos na forma de mediana e percentis e gráficos em *Box-Plots*. Nesse gráfico constrói-se uma caixa retangular cuja base inferior está situada na altura do primeiro quartil (percentil 25%) e a base superior na altura do terceiro (percentil 75%). Do elemento mais alto, traça-se uma linha até o centro da base superior da caixa (percentil 90%), o mesmo ocorrendo com o elemento mais baixo (percentil 10). Foi considerado estatisticamente significativo um $P < 0,05$.

3.16. REAGENTES

Os reagentes utilizados e a sua procedência estão discriminados a seguir:

1. Ovoalbumina Liofilizada – Grau V: Sigma Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil.
2. Ovoalbumina Liofilizada Pura: Advanced Nutrition Ltda., Rio de Janeiro, Brasil.
3. Soro Fisiológico a 0,9%: Baxter Hospitalar, São Paulo, Brasil.
4. Pentobarbital Sódico a 3%: Cristália Prod. Químicos Farm. Ltda., São Paulo, Brasil.
5. Metacolina: Sigma Chemical CO., St. Louis, Missouri, EUA.
6. Paraformaldeído: Sigma Chemical CO., St. Louis, Missouri, EUA.
7. Álcool: Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
8. Clorofórmio: Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
9. Clorofórmio-cetona: Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
10. Hematoxilina: Qeel, São Paulo, Brasil.
11. Eosina: Vetec, Rio de Janeiro, Brasil.

12. Nitrogênio Líquido: Air Products – IBG – Ind. Brasileira de Gases Ltda., São Paulo, Brasil.
13. Heparina: Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil.
14. Poli-L-lisina: Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
15. Tissue Freezing Médium: Jung – Leica Instruments GmbH, Heidelberger Str., Nussloch, Germany.
16. Diamino-Benzidina: Sigma Chemical CO., St. Louis, Missouri, EUA.
17. Cianeto de Potássio (KCN): Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
18. H₂O₂: Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
19. Azul de Evans: Sigma, EUA
20. Picro-sírius (F3BMOBAY): Aldrich Chemical Co., Union NJ Inc., Milwaukee, EUA.
21. Resorcina-fucsina: Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil.
22. Oxona: Qeel, São Paulo, Brasil.

RESULTADOS

PARTE A: Modulação por diferentes modelos de indução de tolerância oral em cobaias: avaliação da hiper-responsividade brônquica, do óxido nítrico exalado, da inflamação pulmonar crônica, da produção de anticorpos anafiláticos e da eosinofiloiose.

4.1.A. TEMPO DE INALAÇÃO

Durante as quatro primeiras inalações com aerossol de ovoalbumina (OVA) não foram observados sinais de desconforto respiratório em nenhum dos animais estudados. Na FIGURA 11 demonstramos as médias e o erro padrão dos valores do tempo de inalação (segundos) correspondentes às 5^a, 6^a e 7^a inalações do grupo de cobaias expostas à ovoalbumina em aerossol (grupo OVA) e dos grupos de tolerância (grupos TO1 e TO2). A partir da 5^a inalação houve redução do tempo de inalação nos animais sensibilizados (grupo OVA: média $\pm$ erro padrão: 296,75 $\pm$ 63,28; 361,70 $\pm$ 64,07; 240,75 $\pm$ 31,50 segundos para 5^a, 6^a e 7^a inalações, respectivamente) comparativamente ao grupo controle salina (grupo SAL, $P < 0,05$).

O tempo de inalação do grupo de cobaias que receberam inalações com OVA e tomaram OVA a 2% *ad libitum* no mesmo período (grupo TO1: 642,56 $\pm$ 59,13; 795,48 $\pm$ 48,80; 825,16 $\pm$ 37,91 segundos para 5^a, 6^a e 7^a inalações, respectivamente) e cobaias que receberam aerossol de OVA e começaram a

receber OVA por via oral após a 4^a inalação (grupo TO2: $636,20 \pm 61,59$; $773,50 \pm 43,93$; $797,72 \pm 41,58$ segundos para a 5^a, 6^a e 7^a inalações, respectivamente) foram capazes de permanecer mais tempo em contato com o antígeno inalatório quando comparados com os animais do grupo OVA. Este comportamento ocorreu durante a 5^a, 6^a e 7^a inalações ($P < 0,05$ para todas as comparações).

As cobaias do grupo SAL permaneceram 900 segundos sem sinais de desconforto respiratório durante as sete inalações.

4.2.A. CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO AR EXALADO (NO_{ex})

A FIGURA 12 demonstra os valores basais de NO_{ex} dos quatro grupos estudados. Houve aumento do óxido nítrico exalado basal nas cobaias do grupo OVA ($26,45 \pm 2,14$ ppb) em relação ao grupo SAL ($18,47 \pm 1,26$; $P < 0,05$). Não foram observadas diferenças nos níveis de NO_{ex} no grupo TO1 ($23,40 \pm 1,60$ ppb) e TO2 ($22,27 \pm 1,35$ ppb) comparativamente ao grupo OVA.

FIGURA 11: Valores do tempo da 5ª, 6ª e 7ª inalações (segundos) dos grupos experimentais que foram expostos à repetidas inalações com aerossol de ovoalbumina (grupo OVA) e animais expostos ao aerossol de ovoalbumina e receberam ovoalbumina por via oral (grupos TO1 e TO2). Os animais do grupo SAL permaneceram os 900 segundos durante todas as inalações. Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Nota-se que os animais dos grupos TO1 e TO2 permaneceram mais tempo em contato com o antígeno inalatório, comparativamente às cobaias do grupo OVA. *P < 0,05 comparado com grupo TO1 e TO2.

FIGURA 12: Valores basais de óxido nítrico exalado (NO_{ex}, ppb) dos quatro grupos estudados. Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Houve aumento do NO_{ex} dos animais do grupo OVA, comparativamente aos animais do grupo SAL. Nota-se que não houve diferenças entre os grupos TO1 e TO2, comparativamente aos grupos SAL e OVA. *P < 0,05 comparado com SAL.

4.3.A. MECÂNICA PULMONAR

Não foram encontradas diferenças nos valores basais de Rrs (grupo OVA: $0,20 \pm 0,02$; grupo SAL: $0,20 \pm 0,01$; grupo TO1: $0,27 \pm 0,06$; grupo TO2: $0,28 \pm 0,03$ cmH₂Oml⁻¹.s) e Ers (grupo OVA: $2,76 \pm 0,08$; grupo SAL: $2,64 \pm 0,17$; grupo TO1: $2,18 \pm 0,14$; grupo TO2: $2,40 \pm 0,23$ cmH₂Oml⁻¹) nos quatro grupos estudados.

A FIGURA 13 demonstra os dados da porcentagem de aumento máximo da Rrs, obtidos após a inalação com aerossol de ovoalbumina (30 mg/ml) ou soro fisiológico a 0,9% dos quatro grupos estudados. Observa-se que houve um aumento significativo no grupo OVA ($141,85 \pm 6,60\%$) e grupo TO1 ($108,19 \pm 36,34\%$) comparativamente aos grupos SAL ($7,99 \pm 1,65\%$), e TO2 ($36,23 \pm 15,57\%$) ($P < 0,05$ para todas as comparações).

A porcentagem de aumento máximo da elastância do sistema respiratório após inalação com aerossol de ovoalbumina (FIGURA 14) foi significativamente maior no grupo OVA ($404,77 \pm 38,70\%$) em comparação aos valores obtidos nos animais do grupo SAL ($17,27 \pm 6,36\%$; $P < 0,05$). Houve redução dessa resposta nas cobaias do grupo TO1 ($253,55 \pm 69,97\%$) e do grupo TO2 ($58,48 \pm 42,69\%$) comparativamente ao observado no grupo OVA ($P < 0,05$ para todas as comparações). O grupo TO2 apresentou ainda diminuição significativa da

porcentagem de aumento máximo da Ers, em comparação ao obtido nos animais do grupo TO1 ($P < 0,05$).

FIGURA 13: Valores da porcentagem de aumento da resistência do sistema respiratório (Rrs) obtidos nos quatro grupos estudados. Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Somente os animais do grupo TO2 apresentaram redução da porcentagem de aumento da Rrs, sendo que essa resposta não foi observada em TO1. * $P < 0,05$, comparado com SAL e TO2.

FIGURA 14: Valores da porcentagem de aumento da elastância do sistema respiratório (Ers) dos quatro grupos estudados. Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Nota-se que houve diminuição na porcentagem de aumento da Ers nos grupos TO1 e TO2. * $P < 0,05$, comparado com SAL, TO1 e TO2. ** $P < 0,05$, comparado com OVA e TO1.

4.4.A. CURVA DOSE-RESPOSTA À METACOLINA

A FIGURA 15 A e 15 B demonstra a curva dose-resposta à metacolina nos valores de Rrs e Ers, respectivamente, dos quatro grupos estudados obtidos na situação basal, após a infusão de 1 ml/kg (por via intravenosa) de soro fisiológico a 0,9% (solução salina) e após administrações (por via intravenosa) de doses de metacolina em concentrações crescentes.

Para analisarmos os posicionamentos das curvas dose-resposta descritas acima, foram calculados a resposta máxima (variação máxima de Rrs e Ers atingida, $\Delta_{\max}$ Rrs e $\Delta_{\max}$ Ers, respectivamente) e as doses responsáveis por 50% da resposta máxima da resistência e da elastância do sistema respiratório (ED_{50} Rrs e ED_{50} Ers, respectivamente), o que permitiu a avaliação da reatividade e da sensibilidade brônquica, como descrito anteriormente.

Os valores da diferença das variações máximas de Rrs obtidas após administração de metacolina ($\Delta_{\max}$ Rrs) dos quatro grupos estudados estão demonstrados na FIGURA 16. A $\Delta_{\max}$ Rrs no grupo SAL ($1,18 \pm 0,11 \text{ cmH}_2\text{O.ml}^{-1}.\text{s}$) e no grupo TO2 ($1,19 \pm 0,06 \text{ cmH}_2\text{O.ml}^{-1}.\text{s}$) foi significativamente menor que os valores obtidos nos animais do grupo OVA ($1,86 \pm 0,30 \text{ cmH}_2\text{O.ml}^{-1}.\text{s}$, $P < 0,05$ para ambos). Não houve diferença entre os resultados obtidos no grupo OVA em relação ao grupo TO1 ($1,45 \pm 0,05 \text{ cmH}_2\text{O.ml}^{-1}.\text{s}$).

Não houve diferenças na avaliação da ED₅₀Rrs nos quatro grupos estudados (FIGURA 17).

Na FIGURA 18 estão apresentados os valores da diferença das variações máximas de Ers obtidas após administração de metacolina (Δ max Ers) dos quatro grupos estudados. Foi observado aumento dos valores de Δ max Ers no grupo OVA ($34,81 \pm 3,01 \text{ cmH}_2\text{O}.\text{ml}^{-1}$), comparativamente ao obtido no grupo SAL ($23,34 \pm 1,66 \text{ cmH}_2\text{O}.\text{ml}^{-1}$, $P < 0,05$). Notou-se também que houve atenuação da resposta observada nos grupos TO1 ($22,26 \pm 1,05 \text{ cmH}_2\text{O}.\text{ml}^{-1}$) e TO2 ($21,11 \pm 1,48 \text{ cmH}_2\text{O}.\text{ml}^{-1}$), em comparação ao observado no grupo OVA ($P < 0,05$). Houve redução nos valores de ED₅₀Ers no grupo de cobaias do grupo OVA, comparativamente ao grupo SAL (FIGURA 19).

FIGURA 15: Curva dose-resposta à metacolina mostrando os valores de Rrs (A) e Ers (B) dos quatro grupos estudados, obtidos nas condições basais (basal) e após a administração por via intravenosa de solução de soro fisiológico a 0,9% (salina) e de concentrações crescentes de metacolina. Os dados estão expressos em média e erro padrão.

FIGURA 16: Valores máximos da Rrs na curva dose-resposta à metacolina ($\Delta_{\max}$ Rrs). Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. A resposta máxima de Rrs foi atenuada somente no grupo TO2, comparativamente ao grupo OVA. *P < 0,05 comparado com SAL e TO2.

FIGURA 17: Dose de metacolina responsável para que se atinja resposta de Rrs equivalente a 50% do valor da resposta máxima (ED₅₀Rrs). Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Não houve diferenças entre os grupos estudados.

FIGURA 18: Valores máximos da Ers na curva dose-resposta à metacolina ($\Delta_{\max}$ Ers). Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Nos grupos TO1 e TO2 houve atenuação da resposta máxima de Ers na curva dose resposta à metacolina. *P < 0,05 comparado com SAL, TO1 e TO2.

FIGURA 19: Dose de metacolina responsável para que se atinja resposta de Ers equivalente a 50% do valor da resposta máxima (ED₅₀Ers). Os valores estão representados em barras paralelas que expressam a média e o erro padrão. Nota-se que houve um desvio para a esquerda da curva obtida com os valores dos animais do grupo OVA, comparativamente ao grupo SAL. Não houve diferenças entre os grupos TO1 e TO2 e os grupos OVA e SAL. *P < 0,05 comparado com SAL.

4.5.A. ESTUDO MORFOMÉTRICO

ÍNDICE DE EDEMA PERIBRÔNQUICO (IE)

Na FIGURA 20 estão apresentados os valores do índice de edema peribrônquico (IE) ao redor das vias aéreas não-cartilaginosas dos quatro grupos estudados. Houve aumento na formação de edema peribrônquico nos animais do grupo OVA [mediana (percentis 25%-75%): 25,53(20,74-29,97) μm^2], comparativamente aos animais que receberam inalações com soro fisiológico [grupo SAL: 10,78(7,11-16,22) μm^2 , $P < 0,05$]. Nos animais submetidos à tolerância [grupo TO1: 11,24(10,98-13,19) μm^2 e grupo TO2: 11,93(11,12-13,88) μm^2] houve redução do índice de edema peribrônquico (IE) comparativamente aos valores obtidos nos animais do grupo OVA ($P < 0,05$ para todas as comparações). Não houve diferenças entre os valores do IE nos animais dos grupos TO1 e TO2 em relação aos valores obtidos nos animais do grupo SAL.

FIGURA 20: Valores do índice de edema peribrônquico (IE) das vias aéreas não-cartilaginosas dos quatro grupos estudados. O gráfico está representado sob a forma de *Box Plot*. A unidade do índice de edema é μm^2 . Tanto no grupo TO1 como no grupo TO2 houve redução dos valores do IE nas vias aéreas não-cartilaginosas, comparativamente aos animais do grupo OVA. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL, TO1 e TO2.

4.6.A ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

O número de polimorfonucleares (PMN) e o de mononucleares (MN) que infiltram a parede das vias aéreas não-cartilaginosas nos quatro grupos de cobaias estudadas estão representados por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$) nas FIGURAS 21 e 22, respectivamente.

Na FIGURA 21 observa-se que o grupo OVA [24,60 (20,86-30,04) células/ $10^4\mu\text{m}^2$] apresentou aumento no número de PMN nas vias aéreas não-cartilaginosas, comparativamente aos valores obtidos nos animais do grupo SAL [1,38(1,22-2,47) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$]. O número de células PMN presente nas vias aéreas não-cartilaginosas foi significativamente menor nos grupos TO1 e TO2 [2,01(1,51-2,65) e 2,07(1,20-2,52) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, respectivamente] quando comparados aos valores obtidos nos animais do grupo OVA ($P < 0,05$ para ambas as comparações). Nota-se que não houve diferença entre as cobaias dos grupos TO1 e TO2 em relação às cobaias do grupo SAL.

Na FIGURA 22 observa-se que o número de células MN presentes nas vias aéreas não-cartilaginosas foi reduzido em TO2 [16,46(14,66-20,05) células/ $10^4\mu\text{m}^2$], em comparação aos grupos OVA e TO1 [27,96(24,16-43,99) e 23,24(21,21-29,60) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, respectivamente, $P < 0,05$ para todas as comparações]. Cabe notar que não houve diferença entre os grupos TO2 e SAL [4,03(2,15-5,56) células/ $10^4\mu\text{m}^2$] e entre os grupos OVA e TO1.

FIGURA 21: Valores do número de células polimorfonucleares (PMN) por $10^4\mu\text{m}^2$ presentes na parede brônquica (entre o epitélio e a adventícia) das cobaias dos quatro grupos estudados. O gráfico está representado sob a forma de *Box Plot*. Nota-se que o número de células PMN foi reduzido nas cobaias do grupo TO1 e TO2. *P < 0,05 comparado com SAL, TO1 e TO2.

FIGURA 22: Valores do número de células mononucleares (MN) por $10^4\mu\text{m}^2$ presentes na parede brônquica (entre o epitélio e a adventícia) das cobaias dos quatro grupos estudados. O gráfico está representado sob a forma de *Box-Plot*. Apenas a tolerância oral iniciada após a 4^a inalação com ovoalbumina reduziu de maneira significativa o número de células MN ao redor das vias aéreas não cartilaginosas. *P < 0,05 comparado com SAL e TO2.

Na FIGURA 23 estão representadas fotomicrografias de vias aéreas não-cartilaginosas coradas em hematoxilina e eosina (HE) dos quatro grupos de cobaias estudados (aumento de 400x). Considerando uma análise puramente descritiva, observa-se que a via aérea da cobaia do grupo SAL se encontra em estado relaxado, desenhando assim uma luz homogênea. Podemos identificar, da luz para a periferia, quatro compartimentos: a camada epitelial, a lâmina própria, a camada muscular e a camada adventícia (A). Na via aérea da cobaia do grupo OVA há espessamento da parede brônquica e intensa contração da musculatura lisa peribrônquica, provocando, por conseqüência, enrugamento da mucosa que se invagina para a luz brônquica. Pode ser observado ainda um aumento do edema e infiltrado de células inflamatórias peribrônquicas (B). É interessante observar que nas vias aéreas de cobaias dos grupos TO1 (C) e TO2 (D) parece haver uma atenuação dessa resposta.

FIGURA 23: Fotomicrografias de vias aéreas coradas com hematoxilina e eosina (HE) dos animais que receberam inalações com soro fisiológico (grupo SAL, painel A), com ovoalbumina (grupo OVA, painel B) e animais submetidos à tolerância oral (grupo TO1, painel C e grupo TO2, painel D). Na via aérea de uma cobaia do grupo SAL (A) observa-se a manutenção da histoarquitetura da via aérea e da matriz extracelular, em contraste com a via aérea de uma cobaia do grupo OVA (B) que apresenta intensa broncoconstrição associada ao edema peribrônquico e ao infiltrado de células inflamatórias. As vias aéreas dos animais submetidos à tolerância exibiram redução do edema peribrônquico e do infiltrado de células inflamatórias ao redor da via aérea distal. Aumento de 400x.

4.7.A. ESTUDO HISTOQUÍMICO

O infiltrado eosinofílico, nas vias aéreas não cartilaginosas, avaliado por meio da coloração para peroxidase (EPO+) dos quatro grupos estudados está demonstrado na FIGURA 24. As cobaias do grupo OVA [14,28 (5,75-23,59) células/ $10^4\mu\text{m}^2$] apresentaram um infiltrado significativo de células EPO+ ao redor das vias aéreas não-cartilaginosas, comparativamente ao grupo SAL [1,50 (0,5-2,33) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$] e aos grupos submetidos à tolerância (grupo TO1: 0,001(0,00-0,25) e grupo TO2: 0,001(0,00-1,00) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$ para ambos].

As fotomicrografias das vias aéreas não-cartilaginosas coradas pelo método cianeto resistente para peroxidase de eosinófilos (aumento 400X) estão demonstradas na FIGURA 25. A via aérea da cobaia do grupo OVA exibe uma intensa broncoconstrição e resposta inflamatória com aumento no número de eosinófilos EPO+, principalmente na adventícia (B). Nota-se na fotomicrografia do grupo SAL (A) que a via aérea se encontra em estado relaxado e sem positividade para as células EPO. Os grupos que receberam ovoalbumina oral, TO1 (C) e TO2 (D), também se encontram em estado mais relaxado e sem positividade para as células EPO.

FIGURA 24: Valores da contagem de células EPO+ na parede das vias aéreas não-cartilaginosas nos animais dos quatro grupos estudados. O gráfico está representado na forma de *Box-Plot*. Nota-se que no grupo OVA há um aumento do número de células EPO+, e nos grupos submetidos à tolerância (TO1 e TO2) houve redução dessa resposta. Os resultados estão expressos por unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$). * $P < 0,05$ comparado com SAL, TO1 e TO2.

FIGURA 25: Fotomicrografias das vias aéreas não-cartilaginosas submetidas à coloração histoquímica para peroxidase eosinofílica cianeto resistente. Na via aérea da cobaia do grupo OVA (painel B) nota-se intenso infiltrado de células EPO+. Por outro lado, nota-se que nas vias aéreas das cobaias dos grupos SAL (painel A), TO1 (painel C) e TO2 (painel D) há redução desse infiltrado inflamatório eosinofílico. Aumento de 400x.

4.8.A. ANÁLISE DA RESPOSTA EOSINOFÍLICA DE MEDULA ÓSSEA

A FIGURA 26 representa graficamente a comparação do número de eosinófilos na medula óssea dos grupos experimentais. Nas cobaias dos grupos submetidos à tolerância [grupos TO1: média $\pm$ erro padrão: $10,15 \pm 1,03$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$ e TO2 ($11,75 \pm 0,86$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$)] nota-se diminuição do número de eosinófilos na medula óssea, comparativamente aos animais do grupo OVA ($23,03 \pm 7,82$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$). Não houve diferenças entre os resultados obtidos no grupo SAL ($8,53 \pm 0,83$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), comparativamente ao observado nas cobaias dos grupos TO1 e TO2.

Na FIGURA 27 podem-se observar fotomicrografias da medula óssea de cobaias do grupo OVA (B), na qual se observa um grande número de eosinófilos, comparativamente ao observado nos animais do grupos SAL, TO1 (C) e TO2 (D).

FIGURA 26: Valores de eosinófilos na medula óssea. Os valores estão representados em barras paralelas e expressos como média e erro padrão. Observa-se redução nos valores de eosinófilos na medula óssea nos animais dos grupos TO1 e TO2, comparativamente aos animais do grupo OVA. *P < 0,05 comparado com SAL, TO1 e TO2.

FIGURA 27: Fotomicrografias da medula óssea coradas em HE de animais dos quatro grupos: grupo SAL (painel A); grupo OVA (painel B); grupo TO1 (painel C) e grupo TO2 (painel D). Nota-se no grupo sensibilizado (painel B) que há aumento do número de eosinófilos na medula óssea, comparativamente aos demais grupos. Aumento 1.000x.

4.9.A. ANTICORPOS ANAFILÁTICOS

A avaliação da presença de anticorpos IgG₁ foi realizada pela reação da anafilaxia cutânea passiva (PCA) em animais de todos os grupos. Os títulos de anticorpos IgG₁ dos animais sensibilizados foram, depois de duas e quatro semanas de inalações, de 1/320 e 1/1280, respectivamente. As cobaias submetidas à tolerância tiveram um nível mais baixo de IgG₁ no final do período experimental (TO1: 1/40 e TO2: 1/20).

PARTE B: Papel da indução de tolerância oral no remodelamento das vias aéreas e na expressão da óxido nítrico sintase neuronal

Para avaliar o efeito da tolerância oral no remodelamento das vias aéreas no modelo de inflamação crônica das vias aéreas em cobaias, nessa segunda etapa do projeto foram quantificadas as fibras elásticas e as fibras de colágeno na parede das vias aéreas. Além disso, foi avaliada a positividade para nNOS nas células epiteliais para esclarecer se a não-redução do NO_{ex} nos grupos TO1 e TO2 (descrito na Parte A do projeto), apesar da diminuição do processo inflamatório, poderia dever-se ao aumento na expressão da óxido nítrico sintase neuronal.

4.1.B. DETECÇÃO DE nNOS EM CÉLULAS EPITELIAIS

Houve diminuição das células epiteliais brônquicas nNOS positivas do grupo SAL [mediana (percentis 25%-75%): 1,44 (0,56-4,30) células/10⁴µm²], comparativamente ao grupo OVA [5,15 (1,09-8,99) células/10⁴µm²] (P < 0,05; FIGURA 28). Não houve diferença entre os grupos submetidos à tolerância (grupos TO1 e TO2) e os grupos SAL e OVA [grupo TO1: 2,38(1,17-4,70) e grupo TO2: 3,02 (1,72-4,12) células/10⁴µm²].

Na FIGURA 29 observam-se fotomicrografias das vias aéreas não-cartilaginosas dos animais dos quatro grupos estudados (imunoistoquímica para nNOS, aumento de 400x). Analisando descritivamente os grupos, nota-se um número maior de células inflamatórias nNOS positivas no grupo OVA, principalmente na adventícia, comparativamente ao observado nos demais grupos experimentais. Nota-se, ainda, uma quantidade aumentada de células epiteliais nNOS positivas no grupo OVA, comparativamente ao grupo SAL.

FIGURA 28: Valores da contagem de células epiteliais brônquicas nNOS positivas das vias aéreas não-cartilaginosas nos quatro grupos estudados. O gráfico está representado na forma de *Box Plot*. Houve aumento do número de células epiteliais nNOS positivas no grupo OVA. Não houve atenuação dessa resposta nos grupos TO1 e TO2, comparativamente a grupo OVA. *P < 0,05 comparado com o grupo SAL.

FIGURA 29: Fotomicrografia das vias aéreas não-cartilaginosas de cobaias dos quatro grupos estudados. Estes fragmentos pulmonares foram submetidos à coloração imunoistoquímica para a detecção de nNOS. Nota-se maior quantidade de células inflamatórias nNOS positivas no grupo OVA, comparativamente aos demais grupos, e aumento de células epiteliais nNOS positivas no grupo OVA, comparativamente ao grupo SAL. Aumento de 400x.

4.2.B. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS FIBRAS DE COLÁGENO E ELÁSTICA NAS VIAS AÉREAS

Foi avaliada a área ocupada pelas fibras de colágeno nas paredes das vias aéreas dos quatro grupos estudados. Na FIGURA 30 estão representadas as fotomicrografias das vias aéreas coradas com picro-sírius polarizadas (painéis à esquerda) e o *threshold* dos tons das cores que representam as fibras de colágeno positivas (painéis à direita). Considerando uma análise exclusivamente descritiva, percebe-se que na via aérea da cobaia do grupo OVA há intenso depósito de colágeno, particularmente na camada externa (adventícia) (B), comparativamente aos demais grupos. A via aérea da cobaia do grupo SAL apresenta quantidade de colágeno compatível com a manutenção da arquitetura fisiológica da via aérea (A). Nota-se que nas vias aéreas das cobaias dos grupos TO1 e TO2 há redução no depósito de fibras de colágeno (painéis C e D, respectivamente), comparativamente ao observado na via aérea da cobaia do grupo OVA.

FIGURA 30: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com picro-sírius e polarizadas (painéis à esquerda) e os respectivos *thresholds* (painéis à direita). Na via aérea do animal do grupo SAL nota-se fraca birrefringência na parede da via aérea compatível com a manutenção da histoarquitetura da via aérea (A). Em contraste, a via aérea da cobaia do grupo OVA apresenta um aumento na birrefringência da sua parede, particularmente na camada adventícia (B). As vias aéreas das cobaias dos grupos TO1 e TO2 apresentam redução significativa na quantidade de fibras de colágeno (C e D). Aumento de 200x.

Ao realizarmos as medidas por densidade óptica das fibras elásticas nas vias aéreas, inicialmente estabelecemos um *threshold* dos tons de cores que representam as fibras elásticas para quantificá-las na área da parede determinada previamente. No entanto, as fibras elásticas ocupam uma área menor que aquela ocupada pelas fibras de colágeno, como pode ser evidenciado ao observar as FIGURAS 31 e 32.

Nota-se ainda, nas fotomicrografias das vias aéreas coradas por resorcina-fucsina com oxidação prévia com os seus respectivos *thresholds*, que há aumento dessa rede de fibras na região subepitelial no grupo OVA (B) comparativamente aos demais grupos (FIGURA 32). A via aérea da cobaia controle (A) demonstra a rede de fibras elásticas compatível com sua estrutura fisiológica normal. Nesse contexto descritivo, podemos observar uma diminuição na rede de fibras do sistema elástico nos grupos TO1 e TO2 (C e D), comparativamente ao grupo OVA.

Para a quantificação das alterações descritas acima, os cortes histológicos de pulmões de todos os animais de experimentação foram submetidos à análise morfométrica para a quantificação das fibras de colágeno e elásticas.

FIGURA 31: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com resorcina-fucsina (painéis à esquerda) e os respectivos *thresholds* (painéis à direita). Nota-se aumento da quantidade de fibras elásticas na camada subepitelial no grupo OVA (B), comparativamente aos grupos SAL (A), TO1 (C) e TO2 (D). Aumento de 200x.

FIGURA 32: Fotomicrografias de cortes histológicos corados com resorcina-fucsina com oxidação prévia (painéis à esquerda) e os respectivos *thresholds* (painéis à direita). Nota-se também aumento da camada de fibras elásticas na camada subepitelial no grupo OVA (B), comparativamente aos grupos SAL (A), TO1 (C) e TO2 (D). Aumento de 200x.

A TABELA 1 apresenta os dados referentes às medidas de espessura, diâmetro, perímetro e área das vias aéreas; comprimento da membrana basal e índice 0,6 (diâmetro externo/interno menor dividido pelo diâmetro externo/interno maior da via aérea) dos quatro grupos experimentais estudados, bem como as comparações entre os grupos. Foi considerada para leitura somente as vias aéreas cuja divisão do diâmetro externo/interno menor pelo diâmetro externo/interno maior da via aérea fosse maior que 0,6.

A análise quantitativa da área ocupada pelas fibras de colágeno e pelas fibras do sistema elástico na parede da via aérea está demonstrada em porcentagem na FIGURA 33. A exposição à ovoalbumina inalatória (grupo OVA) aumentou os valores da porcentagem de colágeno na parede da via aérea ($4,15 \pm 1,52\%$) comparativamente ao observado nos grupos SAL ($2,77 \pm 1,20\%$), TO1 ($2,02 \pm 1,06\%$) e TO2 ($2,24 \pm 0,88\%$, $P < 0,05$ para todas as comparações).

TABELA 1: Média e erro padrão dos parâmetros avaliados nas vias aéreas em cada um dos grupos experimentais.

PARÂMETROS	SAL	OVA	T01	T02
Espessura média	28,63 ($\pm 1,73$)*	46,69 ($\pm 1,85$)	33,99 ($\pm 1,41$)*	37,40 ($\pm 2,34$)* □
Média do diâmetro externo	203,28 ($\pm 10,19$)	213,08 ($\pm 8,86$)	214,32 ($\pm 10,07$)	209,74 ($\pm 9,03$)
Média do diâmetro interno	134,27 ($\pm 7,26$)	128,76 ($\pm 5,26$)	134,12 ($\pm 5,56$)	132,70 ($\pm 5,75$)
Índice 0,6 externo	0,86 ($\pm 0,01$)	0,79 ($\pm 0,01$)	0,85 ($\pm 0,01$)	0,86 ($\pm 0,01$)*
Índice 0,6 interno	0,82 ($\pm 0,02$)	0,77 ($\pm 0,01$)	0,79 ($\pm 0,02$)	0,81 ($\pm 0,02$)
Área total	30175,57 ($\pm 2364,55$)*	41428,25 ($\pm 2491,96$)	38210,18 ($\pm 3338,51$)	35925,95 ($\pm 2991,77$)
Perímetro externo	749,17 ($\pm 32,52$)*	923,73 ($\pm 31,10$)	797,14 ($\pm 32,94$)*	755,72 ($\pm 31,18$)*
Área da luz	12771,21 ($\pm 1606,70$)	10299,17 ($\pm 1180,85$)	11050,53 ($\pm 1048,75$)	11189,44 ($\pm 963,90$)
Perímetro interno	551,40 ($\pm 46,39$)	530,52 ($\pm 39,63$)	575,24 ($\pm 41,16$)	561,54 ($\pm 44,85$)
Área da parede	17404,36 ($\pm 1496,41$)*	31171,92 ($\pm 1875,51$)	27159,65 ($\pm 2581,09$)	24736,50 ($\pm 2326,58$)
Comprimento da membrana basal	811,45 ($\pm 65,17$)	1011,66 ($\pm 50,06$)	797,34 ($\pm 51,77$)*	831,64 ($\pm 63,52$)

*P < 0,05 comparado com grupo OVA, e □P < 0,05, comparado com grupo SAL.

A caracterização da rede de fibras do sistema elástico foi possibilitada por intermédio do uso de colorações seletivas, como descrito anteriormente. Estas colorações tingem de cor fúcsia-escura as fibras do sistema elástico, permitindo diferenciá-las dos demais elementos.

Na análise do percentual da área ocupada pelas fibras elásticas verdadeiras (fibras elásticas propriamente ditas ou simplesmente fibras elásticas) e pelas fibras elaunínicas, ambas coradas pelo método resorcina-fucsina, nota-se que houve diminuição nos grupos TO1 ($3,33 \pm 1,41\%$) e TO2 ($2,76 \pm 0,97\%$) comparativamente aos resultados obtidos no grupo OVA ($4,43 \pm 1,09\%$, $P < 0,05$ para ambos). Nessa análise quantitativa, evidencia-se que o grupo TO1 foi diferente do grupo SAL ($2,60 \pm 1,05\%$ fibras elásticas) e essa diferença não foi constatada em relação ao grupo TO2 (FIGURA 33).

Nos cortes histológicos submetidos à coloração resorcina-fucsina previamente oxidada foi constatado que houve diminuição no percentual de área ocupada pelas fibras do sistema elástico na parede das vias aéreas nos grupos TO1 ($3,69 \pm 2,51\%$) e TO2 ($2,59 \pm 1,33\%$) comparativamente ao grupo OVA ($5,32 \pm 3,32\%$, $P < 0,05$ para todas as comparações). Não houve diferença entre os grupos TO1, TO2 e SAL (grupo SAL: $2,99 \pm 2,96\%$, FIGURA 33).

FIGURA 33: Gráfico demonstrando a porcentagem de área das vias aéreas (%) ocupada pelas fibras de colágeno e elástica dos quatro grupos estudados. Nas vias aéreas das cobaias do grupo OVA houve aumento da porcentagem de colágeno e de fibras elásticas. Nas vias aéreas dos animais dos grupos TO1 e TO2 houve redução dessa resposta. * $P < 0,05$ comparado com os grupos SAL, TO1 e TO2. ** $P < 0,05$ comparado com os grupos SAL e OVA.

Na fase inicial deste trabalho foram avaliadas as intensidades da resposta de hiper-responsividade brônquica específica e inespecífica, a produção de óxido nítrico exalado, a modulação da resposta inflamatória e da eosinofiloiose, bem como a produção de anticorpos IgG₁ em dois modelos de indução de tolerância oral em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica. Posteriormente, foram avaliados os efeitos da indução de tolerância oral no remodelamento das vias aéreas, particularmente analisando a resposta do depósito de colágeno e fibras elásticas na parede brônquica. A partir da fase inicial do estudo, foi possível detectar que havia uma dissociação entre controle da resposta inflamatória e produção de óxido nítrico. Havendo, portanto, redução da ativação da isoenzima induzida responsável pela produção de óxido nítrico, consideramos oportuno avaliar a expressão da óxido nítrico sintase constitutiva que tem maior expressão no epitélio brônquico, que é representada pela óxido nítrico sintase neuronal.

Tanto as cobaias que receberam ovoalbumina por via oral desde o começo do protocolo de inalações (grupo TO1) quanto as cobaias do grupo que receberam ovoalbumina por via oral apenas a partir da quarta inalação (grupo TO2) conseguiram permanecer por mais tempo em contato com a nebulização de ovoalbumina sem apresentar desconforto respiratório, comparativamente às cobaias do grupo sensibilizado e não submetido à tolerância oral (grupo OVA). Este resultado pode ser quantificado pelo aumento do parâmetro denominado previamente de tempo de inalação (FIGURA 12) e sugere uma atenuação da resposta imediata de obstrução brônquica modulada pela indução de tolerância oral.

Na avaliação da mecânica pulmonar, a porcentagem de aumento máximo da elastância do sistema respiratório (Ers) após o desafio com altas doses de antígeno (30 mg/ml) e a hiper-reatividade nos valores máximos de Ers, avaliados por meio da curva dose-resposta à metacolina, foram atenuadas nos dois grupos submetidos ao protocolo de tolerância (TO1 e TO2). Entretanto, somente as cobaias do grupo TO2 apresentaram diminuição da porcentagem de aumento da resistência do sistema respiratório (Rrs) após broncoprovocação e na hiper-reatividade nos valores de Rrs.

Estes resultados sugerem que a indução de tolerância oral pode contribuir para o controle da hiper-reatividade brônquica específica e inespecífica, particularmente considerando a resposta das vias aéreas distais e do parênquima pulmonar, o que foi avaliado por intermédio das medidas relacionadas à elastância do sistema respiratório. A atenuação desse tipo de resposta nas vias aéreas proximais foi significativa somente quando a indução de tolerância oral foi utilizada de maneira terapêutica, o que claramente sinaliza um aspecto benéfico dessa proposta em modelo experimental de inflamação alérgica crônica.

A modulação da resposta inflamatória de vias aéreas foi avaliada por meio das análises morfométrica, histopatológica e histoquímica, notando-se que o índice de edema, o número de células polimorfonucleares (PMN) e os eosinófilos EPO+ ao redor das vias aéreas distais dos grupos de tolerância (TO1 e TO2) foram significativamente menores em relação aos valores obtidos no grupo OVA e não foram evidenciadas diferenças em relação ao grupo controle (grupo SAL). A

eosinofiloiose também foi reduzida significativamente nos grupos TO1 e TO2, comparativamente ao grupo sensibilizado.

O NO_{ex}, considerado como marcador indireto do processo inflamatório, não foi afetado nos dois grupos de tolerância. Foi observado também que não existiram diferenças na quantificação da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal nas células epiteliais entre os grupos de tolerância e o grupo OVA. Esses resultados sugerem um envolvimento da óxido nítrico sintase neuronal epitelial na produção do óxido nítrico exalado.

Aparentemente, esse resultado poderia sugerir a não-modulação pela tolerância oral da expressão dessa isoenzima. Cabe, contudo, ressaltar que o aumento da expressão da nNOS nas cobaias apenas sensibilizadas pode representar um mecanismo contrarregulador, atenuando a obstrução brônquica presente nesses animais. Nos animais submetidos à tolerância houve redução significativa desse processo inflamatório e da obstrução brônquica. Isto sugere que os mecanismos de indução de tolerância oral possam atenuar de maneira diferente no estímulo ao aumento da expressão dessa via enzimática. Novos estudos são necessários para o esclarecimento das vias de ativação celular envolvidas nessa resposta.

No presente estudo também foi quantificada a produção de anticorpos IgG₁ detectados por meio da reação da anafilaxia cutânea passiva (PCA). As cobaias do grupo OVA apresentaram positividade da reação de PCA até a diluição de 1:1.280. Os animais dos grupos TO1 e TO2 apresentaram positividade da reação até as diluições de 1:40 e 1:20, respectivamente. Estes resultados confirmaram a

atenuação da resposta imunológica de produção de anticorpos anafiláticos pela indução de tolerância oral.

Foi evidenciado pela primeira vez neste estudo que a tolerância oral diminuiu a porcentagem de fibras elásticas e de colágeno na parede das vias aéreas, atuando como modulador da resposta de remodelamento neste modelo experimental de asma.

5.1. ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL

A tolerância oral é um processo imunológico induzido, em que a administração de determinado antígeno solúvel, por via gástrica, induz a um estado de hiporresponsividade a imunizações subseqüentes com o mesmo antígeno por qualquer outra via (Weiner, 2004). Os efeitos moduladores da tolerância oral têm sido estudados, em diversas espécies animais, com diferentes doses, utilizando administrações orais que precedem ou sucedem o desafio imunológico (Russo *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Zemmann *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2006; Futata *et al.*, 2006).

Os resultados desse processo já foram previamente analisados em modelos animais e posteriormente expandidos para o tratamento de doenças auto-imunes e alérgicas em humanos, utilizando para isso os mesmos fundamentos do processo

de tolerância oral utilizados nesses modelos experimentais (Weiner, 2004; Moldoveanu *et al.*, 2004).

Para estudar os efeitos da tolerância oral na modulação da resposta asmática, utilizamos o modelo experimental de inflamação crônica das vias aéreas desenvolvido por Tibério *et al.* (1997). Nesse modelo, as cobaias expostas às repetidas inalações com ovoalbumina apresentaram um aumento da resposta máxima de resistência e elastância do sistema respiratório após a broncoprovocação com o antígeno. Além disso, a análise morfométrica e histopatológica de vias aéreas distais revelou aumento no índice de contração, edema pribrônquico e de células polimorfonucleares e linfomononucleares. A imunoistoquímica revelou que a maioria dos linfócitos presentes na parede da via aérea era de células T CD4+. Utilizando o método histoquímico para peroxidase eosinofílica, foi avaliado o número de eosinófilos na parede das vias aéreas e os resultados apresentaram-se similares.

Esse modelo experimental é reprodutível e foi constatado aumento do óxido nítrico exalado (Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005a, Prado *et al.*, 2005b), da eosinofiloiose (Fernandes, 2004), da expressão de nNOS e iNOS em células inflamatórias e do depósito de colágeno e de fibras elásticas na parede das vias aéreas (Prado, 2004; Prado *et al.*, 2005a; Prado *et al.*, 2005b; Prado *et al.*, 2006).

A presença de broncoconstrição proximal, a resposta imediata e tardia, a inflamação eosinofílica e linfocitária TCD4+, a hiper-responsividade brônquica específica e inespecífica e a presença de resposta de remodelamento pulmonar

são fatores importantes que devem estar presentes em modelos experimentais de asma (O'Byrne e Postma, 1999). Também deve-se levar em consideração as formas de indução da doença, que, no caso da asma, devem ser preferencialmente inalatórias. Além disso, a exposição múltipla ao antígeno é considerada um meio de sensibilização relevante para o estudo da fisiopatologia da asma humana (Kips *et al.*, 1992).

Neste estudo, os dois modelos experimentais de indução de tolerância oral em cobaias com inflamação alérgica crônica (Tibério *et al.*, 1997) foram desenvolvidos para avaliar os efeitos preventivos e terapêuticos dessa intervenção imunologicamente mediada nesse modelo de asma experimental. Desenvolvemos, para isso, um modelo preventivo, no qual a tolerância oral foi iniciada concomitantemente ao processo de sensibilização (grupo TO1), e um modelo terapêutico, em que a tolerância oral foi iniciada a partir da quarta inalação, quando as cobaias já apresentavam anticorpos IgG₁ específicos e uma resposta eosinofílica e linfocitária ao redor das vias aéreas (grupo TO2).

Na literatura, os modelos experimentais de tolerância oral mostraram diminuição de anticorpos antígeno-específicos (Heppell e Kilshaw, 1982; Saklayen *et al.*, 1984; Lundin *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000; Verdolin *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2001; Futata *et al.*, 2006) e nas vias aéreas foi encontrada diminuição da resposta inflamatória eosinofílica, da produção de citocinas Th2, da produção de muco e da hiper-responsividade brônquica (Russo *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002). Em nosso estudo, os resultados referentes aos dois modelos de tolerância oral (TO1 e TO2) são condizentes com a literatura, com

a relevância de utilizar um modelo experimental de inflamação alérgica crônica, no qual as cobaias foram sensibilizadas com múltiplas inalações com o antígeno e com a originalidade de avaliar, sobretudo, o remodelamento das vias aéreas e a importância das vias de produção de óxido nítrico.

Os resultados referentes aos dois modelos de tolerância oral, aqui estudado (TO1 e TO2), serão discutidos a seguir:

5.2. ANTICORPOS ANAFILÁTICOS IgG₁

A resposta de produção de anticorpos anafiláticos em humanos é composta de IgE. No presente modelo experimental em cobaias, a produção de anticorpos anafiláticos detectados por meio da reação da anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi composta fundamentalmente de IgG₁, o que já foi descrito na literatura (Warth *et al.*, 1995). As cobaias que foram apenas sensibilizadas com ovoalbumina inalatória (grupo OVA) apresentaram IgG₁ de 1/320 na quarta inalação e IgG₁ de 1/1280 no final do experimento, como previamente demonstrado (Tibério *et al.*, 1997).

Nos dois grupos de cobaias submetidos à tolerância detectamos baixos níveis de IgG₁ (TO1: 1/40 e TO2: 1/20). O efeito do processo de tolerância oral nas respostas de anticorpos foi previamente demonstrado por outros autores (Heppell e Kilshaw, 1982; Saklayen *et al.*, 1984; Lundin *et al.*, 1996; Russo *et al.*,

1998; Maciel *et al.*, 2000; Verdolin *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2001; Futata *et al.*, 2006).

Contrariamente aos resultados de Keller *et al.* (2006), que encontraram diminuição da resposta alérgica, mas não de anticorpos anafiláticos com a administração por via oral do antígeno após a imunização em modelo experimental de asma em camundongos, nossos resultados revelaram que a administração por via oral do antígeno após a imunização reduziu os anticorpos anafiláticos juntamente com a diminuição da resposta alérgica pulmonar.

5.3. TEMPO DE INALAÇÃO

O processo de exposição crônica inalatória ao antígeno assemelha-se mais ao processo de sensibilização que ocorre na asma. Em modelos experimentais, foi demonstrado que a concentração do antígeno inalatório necessita ser aumentada gradativamente para evitar a tolerância inalatória. Vários autores observaram que a exposição inalatória a concentrações fixas de antígeno pode induzir tolerância inalatória (Yiamouyiannis *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2001; Winkler *et al.*, 2002).

Nesse sentido, Yiamouyiannis *et al.* (1999) estudaram camundongos sensibilizados com ovoalbumina (i.p) e posteriormente submetidos a inalações com doses fixas de ovoalbumina durante um período de até seis semanas. Os

autores demonstraram que essa exposição crônica à ovoalbumina resultou em redução da inflamação e em ausência de hiper-responsividade de vias aéreas e também em diminuição das populações de células B e T no lavado broncoalveolar.

Sakai *et al.* (2001) estudaram camundongos sensibilizados expostos às mesmas concentrações de aerossol de ovoalbumina (três vezes por semana durante seis semanas). Eles demonstraram supressão da inflamação eosinofílica, dos níveis de IgE e da hiper-responsividade das vias aéreas. O remodelamento das vias aéreas, caracterizado pela hiperplasia das células caliciformes e fibrose das vias aéreas, não foi afetado pela tolerância inalatória. Entretanto, houve diminuição do perfil de citocinas Th2, como de IL-4, IL-5 e IL-13, e aumento da produção de IL-12.

Em nosso estudo, as sensibilizações com antígeno inalatório ocorreram de forma crescente para evitar a tolerância inalatória. Os animais que receberam concentrações crescentes de ovoalbumina inalatória e não foram submetidos à tolerância oral (grupo OVA) permaneceram um tempo menor em contato com o antígeno sem apresentar sinais de desconforto respiratório, comparativamente aos animais que receberam inalações com soro fisiológico (grupo SAL), sendo essa resposta observada após a quinta inalação. Observamos que ambos os grupos de animais tolerantes permaneceram um período maior em contato com o antígeno inalatório, comparados com as cobaias que receberam exposição à ovoalbumina inalatória.

A reposta imediata ao antígeno específico depende principalmente da contração do músculo liso, da desgranulação mastocitária e da formação do

edema peribrônquico. Nesse contexto, notamos que nos dois grupos de cobaias que receberam ovoalbumina oral houve redução da permeabilidade vascular, principalmente em vias aéreas distais. O controle dessa fase da resposta inflamatória pode ter contribuído para a atenuação da resposta imediata ao contato com o antígeno inalatório.

Entretanto, podemos também considerar que a contratilidade do músculo liso nas vias aéreas e/ou a regulação mastocitária também pode ter sido alterada pela indução da tolerância. A desgranulação dos mastócitos pode ser afetada pelos baixos níveis de IgG₁ encontrados nas cobaias de ambos os grupos com tolerância (TO1: 1/40 e TO2: 1/20).

5.4. RESPOSTA DE MECÂNICA PULMONAR

Embora o processo de sensibilização tenha alterado a resposta aguda ao contato com o antígeno, a concentração do óxido nítrico exalado e ocasionado intensa reação inflamatória, não houve interferências nos valores basais de mecânica do sistema respiratório entre os grupos estudados (dados não demonstrados). Considerando apenas os achados nas cobaias dos grupos OVA e SAL, os achados observados neste estudo reproduzem o que já havia sido previamente demonstrado (Tibério *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2005a, Prado *et al.*, 2005b).

É preciso considerar que a metodologia utilizada permite a avaliação da mecânica do sistema respiratório. É possível que essa metodologia não tenha sensibilidade suficiente para a detecção de mudanças na situação basal. Ponderando essa possibilidade, posteriormente à realização desses experimentos, passamos também a utilizar a avaliação da mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico. Com a utilização dessa metodologia foi possível caracterizar que as cobaias sensibilizadas já apresentam aumento nos valores basais de elastância e resistência tecidual pulmonar (Nakashima *et al.*, 2004; Lanças *et al.*, 2006).

Em seres humanos, o contato com o antígeno inalatório desencadeia duas reações denominadas de imediata e tardia. Hutson *et al.* (1988) demonstraram que essas reações também ocorrem em cobaias, sendo a reação imediata com um pico em 2 horas e duas reações tardias, com picos em 17 horas e em 72 horas. Neste estudo, a resposta de mecânica pulmonar após o desafio com altas doses de antígeno em animais sensibilizados corresponde à resposta asmática imediata que se instala em poucos minutos e é caracterizada pelo rápido edema de mucosa, aumento do tônus do músculo liso com fechamento de vias aéreas, associado à presença e à desgranulação mastocitária (Pauwels, 1989). A contração da musculatura lisa nessa fase parece ser o principal fator da obstrução da luz das vias aéreas.

Com a avaliação da resposta da mecânica do sistema respiratório desencadeada pelo desafio com altas doses de antígeno notamos um aumento tanto da resistência quanto da elastância do sistema respiratório nos animais

sensibilizados, como previamente demonstrado (Tibério *et al.*, 1997 e Prado *et al.*, 2005a, Prado *et al.*, 2005b).

As variações de resistência e elastância do sistema respiratório são um instrumento para estudar o efeito de mediadores inflamatórios e substâncias broncoconstritoras sobre as propriedades mecânicas pulmonares. As alterações da resistência refletem principalmente alterações mecânicas nas vias aéreas centrais, enquanto as variações da elastância estão relacionadas a vias aéreas distais e parênquima pulmonar (Drazen e Austen, 1975; Moreno *et al.*, 1986; Sterk e Bel, 1989).

Alguns autores têm sugerido que a resposta a um estímulo broncoconstritor não depende apenas de alterações da mecânica das vias aéreas, como também de aumentos na resistência tecidual (Ludwing *et al.*, 1988; Romero *et al.*, 1992). Neste contexto, Lanças *et al.* (2006), utilizando fragmentos pulmonares avaliados a partir do método de mecânica oscilatória, demonstraram que, no modelo experimental utilizado, ocorre um aumento de resistência e elastância tecidual periférica nos animais expostos cronicamente a aerossóis de ovoalbumina.

Na avaliação da mecânica pulmonar dos animais que receberam ovoalbumina oral encontramos que a porcentagem de aumento máximo da resistência do sistema respiratório, após o desafio com altas doses de antígeno (30 mg/ml de ovoalbumina), foi somente atenuada nas cobaias do grupo TO2 em relação ao grupo OVA. Entretanto, a resposta máxima de fechamento de vias aéreas distais, avaliada pela porcentagem de aumento máximo da elastância do

sistema respiratório, foi atenuada nos dois grupos submetidos ao protocolo de tolerância (TO1 e TO2).

Observa-se, em nosso estudo, que o grupo TO2 apresentou redução da resposta broncoconstritora em vias aéreas distais e proximais, desencadeada pela inalação do antígeno, enquanto o grupo TO1 modulou o tônus somente das vias aéreas distais. Sendo assim, a possível explicação para a modulação do tônus distal é a diminuição do edema peribrônquico e do depósito de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas distais, como encontrado nos dois modelos de indução de tolerância oral. Contudo, quantificamos o edema peribrônquico em vias aéreas proximais usando o mesmo método morfométrico descrito acima e observamos que somente no grupo TO2 o edema peribrônquico foi reduzido (dados não demonstrados). Desse modo, consideramos que tal alteração morfométrica pode representar um dos determinantes histológicos que contribuiu para a diminuição dos valores de resistência do sistema respiratório, acima descritos.

Nakashima *et al.* (2004) estudaram as respostas de resistência e elastância tecidual a partir do método de mecânica oscilatória nos dois modelos de tolerância oral demonstrado neste estudo. Interessantemente, seus dados revelaram que tanto no grupo TO1 quanto no TO2 houve redução dos valores de resistência e elastância teciduais pulmonares após o desafio com ovoalbumina e acetilcolina. Esses achados corroboram os obtidos no presente estudo, particularmente considerando a resposta da elastância do sistema respiratório. Para uma melhor compreensão e caracterização da relação entre indução de

tolerância oral e resposta de mecânica pulmonar em cobaias com inflamação crônica pulmonar, na etapa seguinte caracterizamos as respostas de hiper-responsividade brônquica por intermédio da avaliação detalhada da curva dose-resposta à metacolina, que será discutida a seguir.

5.5. HIPER-RESPONSIVIDADE À METACOLINA

Para que pudéssemos avaliar o papel da tolerância oral na modulação da hiper-responsividade brônquica não específica, optamos pela administração de metacolina por via intravenosa pela vantagem de infundir uma dose exata da substância, sendo que, por via inalatória, existe depósito de parte do agonista no sistema de nebulização e no respirador. Esse desenho experimental foi realizado em nosso laboratório por Arantes-Costa (2000) em modelo experimental em ratos de forma bastante reprodutível.

Em nosso estudo, utilizamos um índice de sensibilidade (ED_{50} , dose de metacolina necessária para produzir 50% da resposta máxima de Ers e Rrs) e um índice de reatividade (resposta máxima de Rrs e Ers). Embora não exista uma definição específica para separar esses mecanismos, motivo que suscita freqüentes debates, alguns autores dividem os mecanismos da hiper-responsividade brônquica em pré-juncionais (determinando o desvio para a esquerda da curva dose-resposta) e pós-juncionais (determinando o aumento da

resposta máxima). Os primeiros estão associados ao acesso do agonista aos seus receptores no músculo liso brônquico. Assim, lesão epitelial, aumento da permeabilidade do epitélio respiratório, alteração do tônus neural, aumento no número de células e mediadores inflamatórios podem resultar em aumento de sensibilidade. Por outro lado, os mecanismos pós-juncionais envolvem principalmente o resultado da contração do músculo liso, incluindo aumento da sua contratilidade, hiperplasia e hipertrofia muscular, alterações nas cargas elásticas e viscoelásticas, às quais as vias aéreas são submetidas, e edema peribrônquico (Moreno *et al.*, 1986; Sterk e Bel, 1989; Arantes-Costa, 2000; Arantes-Costa *et al.*, 2002).

Em nosso estudo encontramos que o grupo sensibilizado com ovoalbumina inalatória e não submetidos à tolerância (grupo OVA) apresentou aumento da hiper-reatividade à metacolina, tanto na avaliação da resistência quanto da elastância do sistema respiratório. Esses resultados podem ser devidos a aumento da contratilidade, hiperplasia e hipertrofia do músculo liso e do edema peribrônquico, como demonstrado previamente (Tibério *et al.*, 1997). As alterações nas propriedades elásticas e viscoelásticas também se associam a esses fatores, sendo que o aumento de colágeno nesse grupo foi demonstrado tanto por Prado *et al.* (2005b) quanto neste estudo. Encontramos ainda nesse modelo de inflamação crônica de vias aéreas um desvio da curva para a esquerda, fundamentalmente na avaliação dos valores de Ers. Alguns fatores podem ser apontados como determinantes histológicos dessa resposta: lesão epitelial, aumento da permeabilidade do epitélio respiratório, alteração do tônus

neural e aumento de células e mediadores inflamatórios, sendo os últimos fatores já comprovados neste modelo.

Demonstramos que nos dois modelos de indução de tolerância oral (TO1 e TO2) houve redução significativa da resposta máxima de Ers na curva dose-resposta à metacolina. Essa resposta pode ter sido influenciada pela redução do edema peribrônquico e controle do processo de remodelamento em vias aéreas distais, bem como da regulação da resposta contrátil pelo processo de tolerância, embora o último não tenha sido investigado neste estudo.

A resposta máxima de Rrs foi reduzida somente no grupo TO2. Como descrito anteriormente, levantamos a hipótese de que a diminuição do edema de vias aéreas proximais, que foi somente nesse grupo, possa ter influenciado esta resposta.

A avaliação no índice de sensibilidade (ED_{50}) nos valores de Rrs não demonstrou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Entretanto, o ED_{50} dos valores de Ers foi reduzido nas cobaias do grupo OVA quando comparado com o observado nos animais do grupo SAL. Vários fatores podem estar contribuindo para o aumento da sensibilidade nos valores de Ers observado no grupo OVA: lesão epitelial, aumento da permeabilidade do epitélio respiratório, alteração do tônus neural, aumento no número ou ativação de células inflamatórias (aumentando a concentração de mediadores inflamatórios) e diminuição do metabolismo do agonista.

Encontramos ainda que os grupos de tolerância não foram diferentes do sensibilizado, embora tenham demonstrado redução significativa no número de células inflamatórias, particularmente em relação ao número de eosinófilos. Tal fato sugere que os outros mecanismos acima citados possam estar envolvidos na modulação da resposta observada nas cobaias que foram submetidas à tolerância oral. Novos estudos serão necessários para elucidar estas questões.

5.6. ÓXIDO NÍTRICO EXALADO E EXPRESSÃO DA ENZIMA nNOS

O óxido nítrico tem sido utilizado como marcador inflamatório em pacientes com asma (Kharitnov *et al.*, 1994; Kharitonov *et al.*, 1996; Lehtimäki *et al.*, 2002; Ricciardolo *et al.*, 2004) e também em modelos animais com inflamação pulmonar (Mehta *et al.*, 1997; Eynott *et al.*, 2002; Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005b).

Neste estudo, utilizando a avaliação não-invasiva da inflamação pulmonar por meio da medida do óxido nítrico exalado (NO_{ex}) basal, nota-se um aumento dos valores nas cobaias do grupo OVA em relação ao obtido no grupo controle, como foi previamente demonstrado (Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005a; Prado *et al.*, 2005b). As cobaias dos grupos TO1 e TO2 apresentaram valores de NO_{ex} que não diferiram dos valores observados no grupo apenas

inalado com ovoalbumina (grupo OVA). Não encontramos na literatura modelos de tolerância em que a avaliação de NO_{ex} tenha sido realizada.

Considerando que nos dois modelos de indução de tolerância oral houve controle da resposta inflamatória, particularmente eosinofílica, julgamos inicialmente que deveria haver redução dos valores do óxido nítrico exalado. Prado (2004) e Prado *et al.* (2005a) observaram que nesse modelo de inflamação alérgica pulmonar há aumento na expressão, tanto em células inflamatórias quanto no epitélio brônquico, das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) induzida e neuronal. Para compreender os possíveis mecanismos envolvidos na resposta observada quanto ao óxido nítrico exalado, optamos por avaliar a expressão da enzima óxido nítrico sintase constitutiva neuronal, particularmente no epitélio brônquico. Interessantemente, foi observado que a indução de tolerância oral também não atenuou o aumento da expressão dessa enzima nesse modelo de inflamação crônica pulmonar. Concluímos que o NO_{ex} possa estar sendo produzido por ativação da óxido nítrico sintase neuronal nas células epiteliais brônquicas. Outros autores já previamente sugeriram que a ativação da óxido nítrico sintase neuronal pode atenuar a resposta de remodelamento (Prado *et al.*, 2005b).

Nossos resultados sugerem ainda que o óxido nítrico exalado não deve ser sempre considerado como um marcador da resposta inflamatória pulmonar, particularmente em modelos de indução de tolerância oral. Entretanto, mais experimentos serão necessários para a compreensão dos mecanismos

relacionados com o aumento do NO_{ex} e da enzima nNOS em modelos de indução de tolerância oral.

5.7. MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A presença e a ativação de linfócitos e eosinófilos nas vias aéreas têm sido consideradas como fundamentais na etiopatogenia da asma brônquica. Neste estudo, observando as vias aéreas dos animais sensibilizados (grupo OVA), nota-se intenso edema peribônquico, aumento de polimorfonucleares e mononucleares, particularmente eosinófilos EPO+, confirmando resultados prévios (Tibério *et al.*, 1997; Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Prado, 2004). Uma redução do índice de apoptose dessas células inflamatórias em vias aéreas distais também foi constatada neste modelo, o que contribui para a perpetuação desse processo inflamatório (Fernandes *et al.*, 2003; Fernandes, 2004).

Em vários estudos têm sido utilizados modelos experimentais de sensibilização, nos quais se induziu tolerância oral e se avaliou a resposta inflamatória (Haneda *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2006). Esses autores procuraram avaliar a resposta eosinofílica ao redor das vias aéreas e especularam que o desenvolvimento do processo de tolerância foi associado com o desaparecimento da população de linfócitos Th2. Esse efeito foi indiretamente

elucidado por meio da determinação do perfil de citocinas recuperado no fluido do lavado broncoalveolar.

Nossos dados sobre o efeito da tolerância oral corroboram os achados de literatura. Tanto as cobaias que receberam a ovoalbumina oral a partir da primeira inalação (grupo TO1) quanto as que a receberam a partir da quarta inalação reduziram o índice de edema peribrônquico e a resposta de células polimorfonucleares, particularmente eosinófilos nas vias aéreas distais. Nesse aspecto, a diminuição da eosinofiloiose demonstrada nos dois grupos de tolerância reforça a idéia da importância do controle da resposta inflamatória eosinofílica por modulação da resposta imunológica.

Na avaliação do infiltrado mononuclear observamos que a administração oral do antígeno levou a uma redução significativa dessas células somente quando a administração foi iniciada após duas semanas de repetidas exposições com ovoalbumina inalatória (grupo TO2). Nesse aspecto, os animais já estavam sensibilizados e apresentavam anticorpos IgG₁ de 1/320, além de infiltrados eosinofílico e mononuclear ao redor das vias aéreas (dados não mostrados).

Em estudo prévio pudemos concluir que a maioria dessas células no grupo sensibilizado com ovoalbumina e não submetidos à tolerância oral é representada por linfócitos CD3+/CD4+, provavelmente Th2+ (Tibério *et al.*, 1997). Podemos, portanto, inferir que a indução de tolerância oral depois de estabelecida uma resposta tipo Th2 (grupo TO2) foi mais efetiva do que nos animais no qual isso ainda não ocorreu (grupo TO1). Cabe ressaltar ainda que a indução de tolerância oral nos animais do grupo TO2 mostrou efetividade no controle da resposta

linfocitária CD4+, o que demonstra um possível efeito benéfico no controle da resposta inflamatória observada em asmáticos.

O aumento da permeabilidade vascular, avaliada pelo índice de edema peribrônquico, foi modulado com a administração por via oral do antígeno nos dois grupos de animais que receberam ovoalbumina oral. Possivelmente, com a diminuição dos anticorpos anafiláticos IgG₁ não houve ativação da resposta de hipersensibilidade imediata com o desafio ao antígeno e conseqüentemente houve diminuição da desgranulação mastocitária.

Os sinalizadores celulares, modificados pela indução de tolerância oral, que contribuíram para a diminuição da resposta inflamatória pulmonar não foram investigados nesse estudo, mas um dos possíveis fenômenos que podem contribuir para essa resposta se refere a um aumento no número de células inflamatórias em apoptose. A esse respeito, Nakashima *et al.* (2005) avaliaram o índice de apoptose em vias aéreas e parênquima pulmonar nestes dois modelos de tolerância oral. Os resultados revelaram uma pequena porcentagem de células em apoptose nas vias aéreas do grupo sensibilizado (1,45%, grupo OVA) quando comparado aos grupos submetidos à tolerância oral (13,7% em TO1 e 14,2% em TO2). Esses resultados estariam de acordo com a teoria de que a perpetuação da reação inflamatória depende também do bloqueio do processo apoptótico e sugerem que a tolerância oral pode prevenir a instalação do processo inflamatório por intermédio da ativação local da apoptose das células inflamatórias, tanto na parede de vias aéreas quanto nos alvéolos.

5.8. EOSINOFILOPOIESE

A asma, como foi descrita anteriormente, é caracterizada, entre outros achados, pela presença de infiltrado eosinofílico. Os eosinófilos são produzidos na medula óssea e alguns trabalhos mostraram que a exposição pulmonar ao alérgeno resulta em aumento dos eosinófilos no tecido hematopoiético e da migração dessas células para o pulmão (Humbles *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2003; Fernandes, 2004).

Nesse modelo de inflamação crônica de vias aéreas, o número aumentado de eosinófilos na medula óssea foi demonstrado inicialmente por Fernandes (2004) em estudos sobre os efeitos do tratamento com dexametasona e L-NAME em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica. Confirmando esse resultado, o presente estudo demonstrou que o grupo sensibilizado (grupo OVA) apresentou aumento da eosinofiloiose comparado ao grupo normal (grupo SAL).

A saída dos eosinófilos da medula óssea é um sinal precoce no tráfego de eosinófilos para o pulmão durante as reações alérgicas. Os mecanismos moleculares que regulam a saída dos eosinófilos da medula óssea ainda não são bem compreendidos (Hogan *et al.*, 2003). Entretanto, a saída dessas células da medula óssea pode envolver inibição por moléculas de adesão específica, aumento da mobilidade, migração através do compartimento hematopoiético e a transmigração através do endotélio. Alguns autores estudaram a cinética do recrutamento eosinofílico na inflamação alérgica pulmonar.

Palframan *et al.* (1998) demonstraram a rápida migração dos eosinófilos da medula óssea em resposta à administração de IL-5. Houve aumento na expressão eosinofílica de $\beta 2$ integrina e diminuição na expressão de L-selectina. Humbles *et al.* (1997) mostraram que os eosinófilos iniciam progressivamente o processo de saída da medula, começando a partir de uma hora após a broncoprovocação, e são vistos em números elevados no sangue e no pulmão dentro de 3 horas. Essa liberação é, pelo menos em parte, mediada pela IL-5. Hogan *et al.* (2003) revelaram que ocorre aumento das células progenitoras dos eosinófilos na medula óssea após sensibilização com alérgeno nasal. Interessantemente, o aumento da eosinofiloiose precedeu o desenvolvimento de anticorpos IgE específica e foram, em parte, independentes das células T. Seus dados sugerem que a eosinofilia na asma pode ser iniciada por ação das células T e pelas células no estroma da medula óssea, que também produz IL-5, podendo, desta maneira, estimular a eosinofiloiose.

Russo *et al.* (1998) demonstraram que a tolerância oral precedida da imunização inibiu a produção de eosinófilos na medula óssea em dois modelos de asma experimental em camundongos. No presente estudo, realizado em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias, tanto a estratégia preventiva (grupo TO1) como a estratégia terapêutica de indução de tolerância oral (grupo TO2) inibiram a eosinofiloiose. Consideramos que a redução observada nesse parâmetro nos dois modelos de tolerância oral possa ter ocorrido pela diminuição do estímulo inflamatório alérgico, já sinalizado pela

diminuição dos anticorpos anafiláticos IgG₁. Entretanto, os efeitos da tolerância oral nas células do estroma da medula óssea não podem ser excluídos.

5.9. REMODELAMENTO BRÔNQUICO

Na asma, os constantes danos e reparações das estruturas pulmonares decorrentes da agressão mecânica e inflamatória levam às alterações irreversíveis das vias aéreas (Elias, 2000; Holgate, 2001; Vignola *et al.*, 2003a; Phipps *et al.*, 2004; Jeffery, 2004). Essas alterações estruturais na parede das vias aéreas, caracterizadas pelo aumento da espessura da membrana basal, modificações das fibras elásticas e fibras de colágeno e, ainda, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa peribrônquica (Mauad *et al.*, 1999; Elias 2000; Bousquet *et al.*, 2000; Chiappara *et al.*, 2001; Vignola *et al.*, 2003a; McParland *et al.*, 2003; Jeffery 2004; Pascual e Peters, 2005; Yamauchi, 2006), estão relacionadas ao aumento da obstrução das vias aéreas, hiper-responsividade brônquica e contribuem de maneira significativa para a piora clínica (Brusasco *et al.*, 1998; Holgate 2001; Shiba *et al.*, 2002; O'Byrne e Inman, 2003; Brown *et al.*, 2006; Yamauchi, 2006). Além disso, o remodelamento das vias aéreas acarreta a perda da distensibilidade da parede das vias aéreas (Boulet *et al.*, 1995), estreitamento intenso do lúmen decorrente do encurtamento do músculo liso (Kuwano *et al.*, 1993) e limitação ao fluxo aéreo (Boulet *et al.*, 1994). Nesse aspecto, os modelos experimentais de inflamação crônica alérgica das vias aéreas são mais adequados para avaliar o

remodelamento brônquico que modelos de exposição aguda ao antígeno em animais previamente imunizados.

Nossos dados demonstraram que a inflamação crônica nos animais sensibilizados (grupo OVA) se associou ao aumento da espessura da parede das vias aéreas (TABELA 1), assim como da quantidade de fibras colágenas e fibras elásticas depositadas nessa parede (FIGURA 33). Esses dados são coerentes com os resultados de Prado *et al.* (2005b e 2006). Além disso, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que a indução da tolerância oral reduziu as fibras elásticas e de colágeno e, portanto, modulou o remodelamento das vias aéreas nesse modelo experimental de asma e isso pode ter contribuído para a diminuição da hiper-responsividade de vias aéreas distais, como anteriormente demonstrado.

Consideramos que a redução de colágeno observado nos animais tolerizados pode ter ocorrido pelo controle do recrutamento eosinofílico, associado à atenuação da eosinofiloiose. Outros autores demonstraram previamente que macrófagos e eosinófilos ativados produzem TGF- β , que, por sua vez, induz a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, os quais são responsáveis pela produção de colágeno (Zhang *et al.*, 1999; Frieri 2004).

Uma variedade de mediadores tem a capacidade de regular a proliferação de fibroblastos (Elias, 2000). Em especial, as citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) contribuem para o remodelamento (Elias, 2000; Zhu *et al.*, 2001; Kips, 2001; Chung, 2003). Nesse modelo experimental de asma, as células mononucleares são representadas por linfócitos CD4⁺ (Tibério *et al.*, 1997). Considerando que essas células estavam reduzidas somente nos animais do grupo TO2 e o processo

de remodelamento foi atenuado em ambos os grupos submetidos à tolerância oral, nossos dados sugerem que a hipótese da importância da interação entre linfócitos e eosinófilos parece mais relevante para a compreensão dos mecanismos envolvidos no controle do depósito de colágeno que exclusivamente o recrutamento de linfócitos.

Há evidências de que o óxido nítrico possa interferir no remodelamento das vias aéreas, pois sua inibição crônica com L-NAME (falso substrato para todas as óxido nítrico sintases) resultou na amplificação do processo de remodelamento, aumentando o depósito de colágeno na parede das vias aéreas em cobaias com inflamação crônica de vias aéreas (Prado *et al.*, 2005b). Por outro lado, a inibição crônica da iNOS reduziu de maneira significativa a quantidade de fibras colágenas ao redor das vias aéreas distais nesse modelo experimental (Prado *et al.*, 2006). Brown *et al.* (2004) demonstraram que o óxido nítrico pode diminuir os inibidores teciduais das metaloproteinases, aumentando assim sua atividade e reduzindo as fibras colágenas. Essas evidências experimentais contribuem para a compreensão dos resultados encontrados no presente estudo, no qual foi evidenciada diminuição de colágeno nas vias aéreas e não foi encontrada diminuição do NO_{ex} nos animais submetidos à tolerância oral.

Outro achado importante foi a diminuição das fibras elásticas nos dois grupos que receberam ovoalbumina oral (TO1 e TO2). Embora alguns autores tenham estudado as fibras elásticas na asma (Godfrey *et al.*, 1995; Bousquet *et al.*, 1996; Mauad *et al.*, 1999), a avaliação dessa resposta não foi previamente realizada em modelos experimentais de tolerância oral.

Várias células inflamatórias, tal como macrófagos, neutrófilos e também eosinófilos, são capazes de produzir proteases, incluindo elastases e collagenases. Em doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas existe um desbalanço entre essas proteases e seus inibidores, assim como ativação da elastose e fragmentação das fibras elásticas (Bosquet *et al.*, 1996; Mauad *et al.*, 1999). Nossos dados sugerem que os mecanismos envolvidos na redução das fibras elásticas nos animais tolerantes podem estar associados ao controle do recrutamento de eosinófilos. Entretanto, os efeitos na ativação de proteases e seus inibidores não podem ser excluídos, e mais estudos são necessários para elucidar essa possibilidade.

6

CONCLUSÕES

1. No modelo de inflamação crônica das vias aéreas em cobaias, nossos resultados confirmaram as alterações encontradas na mecânica do sistema respiratório após o desafio com a ovoalbumina, o aumento do edema peribrônquico e de células inflamatórias brônquicas, particularmente eosinófilos e células mononucleares, de anticorpos anafiláticos IgG₁, da eosinofiloiose e do óxido nítrico exalado.
2. Nesse modelo de inflamação crônica pulmonar em cobaias, além de todas as alterações descritas acima, foi demonstrada, neste estudo, a existência de hiper-responsividade brônquica à metacolina.
3. Nos dois modelos de tolerância oral desenvolvidos houve redução da hiper-responsividade brônquica específica e inespecífica das vias aéreas distais, da formação de anticorpos anafiláticos IgG₁, da resposta inflamatória eosinofílica, da formação do edema peribrônquico e da eosinofiloiose.
4. Apenas quando a tolerância oral foi induzida em animais previamente sensibilizados (abordagem terapêutica) foi possível atenuar o infiltrado mononuclear brônquico e a resposta de hiper-reatividade específica e inespecífica das vias aéreas proximais.
5. Não houve redução dos valores de óxido nítrico exalado nos animais submetidos à tolerância apesar do controle da resposta eosinofílica.
6. Nesse modelo experimental de inflamação crônica pulmonar ocorre aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal nas células

epiteliais brônquicas, confirmando os resultados anteriores. Esse efeito não foi modificado pela indução de tolerância oral.

7. Notamos que a inflamação crônica pulmonar contribui para o aumento do conteúdo de fibras elásticas e colágenas brônquicas, como previamente descrito. Tanto a abordagem preventiva quanto a terapêutica da indução de tolerância oral podem atenuar essas respostas.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.
- Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Allergy immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD001186.
- Arantes-Costa FM, Zoriki S, Santos MHC, Kobata CHP, Vieira JE, Martins MA. Effects of ventilation, humidity and temperature on airway responsiveness to methacholine in rats. *Eur Respir J*. 2002;19:1008-14.
- Arantes-Costa FM. *Influência da pressão parcial de CO₂ no sangue arterial sobre a responsividade pulmonar à metacolina: um estudo experimental em ratos* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2000.
- Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10089-93.
- Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Moll Biol*. 2003;28:12-24.
- Baluga JC, Sueta A, Ceni M. Asthma mortality in Uruguai, 1984-1998. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87:124-8.
- Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*. 1998;50:515-96.
- Barnes PJ. Neurogenic inflammation in airway. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991;94:303-9.
- Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. 1996;51:218-20.
- Belvisi MG, Stretton D, Barnes PJ. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol*. 1991;198:219-21.
- Belvisi MG. Distribution of human iNANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13:175-84.
- Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:1360-8.
- Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, Menz G, Storz C, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92:857-68.

- Birrell MA, McCluskie K, Haddad E-B, Battram CH, Webber SE, Foster ML, Yacoub MH, Belvisi MG. Pharmacological assessment of the nitric-oxide synthase isoform involved in eosinophilic inflammation in a rat model of sephadex-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304:1285-91.
- Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy*. 2001;56:7-11.
- Bisgaard H. Role of leukotrienes in asthma pathophysiology. *Pediatr Pulmonol*. 2000;30:166-76.
- Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11:35-42.
- Bjorksten B. The environmental influence on childhood asthma. *Allergy*. 1999;54:17-23.
- Bloom B, Dey AN. Summary health statistic for U.S. children: National Health Interview Survey. *Vital Health Stat* 10. 2006;227:1-85.
- Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Maio JL, Boutet M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest*. 1997;112:45-52.
- Boulet LP, Turcotte H, Brochu A. Persistence of airway obstruction and hyperresponsiveness in subjects with asthma remission. *Chest*. 1994;105:1024-31.
- Boulet LP, Turcotte H, Carrier G, Boutet M, Laviolette M. Increased maximal airway response to methacholine during season allergic rhinitis in nonasthmatic patients: relationship with airway wall thickness and inflammation. *Eur Respir J*. 1995;8:913-21.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Verge P, Ahlstedt D, Simony-La fontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*. 1990;323:1033-9.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1720-45.
- Bousquet J, Lacoste JY, Chanez P, Vic P, Godard P, Michel FB. Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:1648-54.
- Brandtzaeg P. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;778:1-27.

- Bredt DS, Hwang MP, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990;347:768-70.
- Brewster CEP, Howarth PH, Dujkanovich R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3:507-11.
- Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:S65-71.
- Brown DJ, Lin B, Chwa M, Atilano SR, Kim DX, Kenney MC. Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis*. 2004;10:281-8.
- Brown RH, Pearse DB, Pyrgos G, Liu MC, Togias A, Permutt S. The structural basis of airway hyperresponsiveness in asthma. *J Appl Physiol*. 2006. Available from: <http://jap.physiology.org/cgi/reprint/01190.2005v1>.
- Brusasco V, Crimi E, Pellegrino R. Airway hyperresponsiveness in asthma: not just a matter of airway inflammation. *Thorax*. 1998;53:992-8.
- Bult H, Boechxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke, YM, Herman AG Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990;345:346-7.
- Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE: levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med*. 1989;320:271-7.
- Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344:350-62.
- Busse WW. Inflammation in asthma: The cornerstone of the disease and target of therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:S17-22.
- Cabral ALB, Conceição GM, Fonseca-Guedes CHF, Martins MA. Exercise-induced bronchospasm in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1819-22.
- Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J*. 1996;9:709-15.
- Carroll NG, Perry S, Karkhanis A, Harji S, Butt J, James AL, Green FHY. The airway longitudinal elastic fiber network and mucosal folding in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:244-8.
- Centers for Disease Control (CDC). National Center for Health Statistic E-Stats - Division of Data Service [cited 2006 April 07]. U.S.: Department of Health and Human Services. Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/products/pubs/pubd/hestats/asthma/asthma.htm>.

- Cerchiaro GA, Scavone C, Texeira S, Sannomiya, P. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin. *Biochem Pharmacol*. 2001;62:357-62.
- Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 1995;376:177-80.
- Chetta HK, Foresi A, Del DM, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. Airway remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. *Chest*. 1997;111:852-7.
- Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Immunol*. 2001;1:85-93.
- Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Shim JY, Raz E, Broide DH. Remodeling associated expression of matrix metalloproteinase 9 but not tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in airway epithelium: modulation by immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:618-25.
- Christopherson KS, Bredt DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*. 1997;100:2424-9.
- Chu HW, Kraft M, Rex MD, Martin RJ. Evaluation of blood vessels and edema in the airway of asthma patients regulation with clarithromycin treatment. *Chest*. 2001;120:416-22.
- Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999;54:825-57.
- Chung KF. Individual cytokines contributing to asthma pathophysiology: valid targets for asthma therapy? *Curr Opin Investig Drugs*. 2003;4:1320-6.
- Chung Y, Cho J, Chang YS, Cho SH, Kang CY. Preventive and therapeutic effects of oral tolerance in a murine model of asthma. *Immunobiology*. 2002;206:408-23.
- Coers W, Timens W, Kempinga C, Klok PA, Moshage H. Specificity of antibodies to nitric oxide synthase isoforms in human, guinea pig, rat and mouse tissues. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:1385-91.
- Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.
- Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. *Science*. 1992;258:1862-3.
- Czerkinsky C, Anjuere F, McGhee JR, Georgy-Chandy A, Holmgren J, Kieny MP, Fujiyashi K, Mestecky JF, Pierrefite-Carle V, Rask C, Sun JB. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol Rev*. 1999;170:197-222.
- Datasus. Sistema de Informações Hospitalares do SUS. Asma [citado 09 de maio 2006]. Disponível em: <http://datasus.gov.br>.

- De Boer J, Duyvendak M, Schuurman FE, Pouw MH, Zaagsma J, Meurs H. Role of L-arginine in the deficiency of nitric oxide and airway hyperreactivity after the allergen-induced early asthmatic reaction in guinea-pigs. *Br J Pharmacol*. 1999;128:1114-20.
- De Sanctis G, Mehta S, Kobzik L, Yandava C, Jiao A, Huang P, Drazen J. Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *Am J Physiol*. 1997;273:L883-8.
- Del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andres B, Cardaba B, Lopez-Farre A, Gallardo S, Cortegano I, Vidarte L, Jurado A, Sastre J, Palomino P, Lahoz, C. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*. 1997;158:859-64.
- Deykin A, Halpern O, Massaro AF, Drazen JM, Israel E. Expired nitric oxide after bronchoprovocation and repeated spirometry in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:769-75.
- Drazen JM, Austen KF. Pulmonary response to antigen infusion in sensitized guinea pig: modification by atropine. *J Appl Physiol*. 1975;39:916-9.
- Driver AG, Kukoly CA, Ali S, Mustafa SJ. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:91-7.
- Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:1322-32.
- Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest*. 1992;90:421-8.
- Durham SR, Lee TH, Cromwell O, Shaw RJ, Merret TG, Merret J, Cooper P, Kay AB. Immunologic studies in allergen-induced late asthmatic reactions. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;74:49-60.
- Elias JA. Airway remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:S168-71.
- Ellis AG. The pathologic anatomy of bronchial asthma. *Am J Med Sci*. 1908;136:407-10.
- Ergun-Longmire B, Marker J, Zeidler A, Rapaport R, Raskin P, Bode B, Schatz D, Vargas A, Rogers D, Schwartz S, Malone J, Krischer J, Maclaren NK. Oral insulin therapy to prevent progression of immune-mediated (type 1) diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1029:260-77.
- Eynott PR, Groneberg DA, Caramori G, Adcock IM, Donnely LE, Kharitonov S, Barnes PL, Chung KF. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol*. 2002;452:123-33.

Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:1126-31.

Fahy JV. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:S46-51.

Faria AMC, Garcia G, Rios MJC, Michalaros CL, Vaz NM. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. *Immunology*. 1993;78:147-51.

Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005;206:232-59.

Faria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol*. 1999;73:153-264.

Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:203-8.

Fernandes FT, Kay F, Leick-Maldonado EA, Prado CM, Kasahara DI, Tibério IFLC, Martins MA. Evaluation of apoptosis in inflammatory cells in a modelo f chronic airway inflammation inguine pigs: effects of dexamethasone and montelukast treatments. *Eur Resp J*. 2003; 22(Suppl. 45):281s. (Presented at European Respiratory Society 13th Annual Congress; 2003 Sep-Oct 30-04; Vienna, Austria. Abstract).

Fernandes FT. *Avaliação da apoptose de células inflamatórias em vias aéreas e medula óssea em modelo de inflamação crônica em cobaias: efeito do tratamento com dexametasona e L-NAME* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Ferreira HH, Lodo ML, Martins AR, Kandratavicius L, Salarolo AF, Conran N, Antunes E, De Nucci G. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. *Eur J Pharmacol*. 2002;442:155-62.

Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996;183:195-201.

Fowler MG, Davenport MG, Garg R. School functioning of US children with asthma. *Pediatrics*. 1992;90:939-44.

Fowler SJ, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1318-22.

Friedman A. Induction of anergy in Th1 lymphocytes by oral tolerance. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;778:103-10.

- Frieri M. Airway epithelial cell release of cytokines: modulation by various therapeutic agents. *Allergy Asthma Proc.* 2004;25:387-93.
- Fujihashi K, Dohi T, Kweon MN, McGhee JR, Koga T, Cooper MD, Tonegawa S, Kiyono H. $\gamma\delta$ T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol.* 1999;11:1907-16.
- Fujihashi K, McGhee JR. Mucosal immunity and tolerance in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 2004;125:889-98.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
- Futata EA, Brito CA, Victor JR, Fusaro AE, Oliveira CR, Maciel Jr M, Duarte AJS, Sato MN. Long-term anergy in orally tolerized mice is linked to decreased B7.2 expression on B cells. *Immunobiology.* 2006;211:157-66.
- Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao X-Q, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-Oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267:761-3.
- Garcia MLB, Paiva PSO, Dolhnikoff M, Jancar S, Saldiva PHN, Martins MA. Airway and pulmonary tissue responses to Platelet-Activating Factor in rats. *Exp Lung Res.* 1994;20:169-84.
- Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1029:9-15.
- Gatto EM, Riobo NA, Carreras MC, Chernavsky A, Rubio A, Satz ML, Poderoso JJ. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide.* 2000;4:534-9.
- Gibson PG, Couglan J, Wilson AJ, Abramson M, Bauman A, Hensley MJ, Walters EH. *Self-management education and regular practitioner review for adults with asthma* [cited 2006 may 09]. Available from: <http://cochrane.bireme.br/cochrane/main.php?lang=&PHPSESSID=272532fd0a90bb7499e5a2bdd631fad4>.
- Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention program*. National Heart, Lung, and Blood Institute/World Health Organization. Workshop Report. Washington, U.S. Department of Health, Education, and welfare; 2005. Publication No. 02-3659.
- Godfrey RWA, Lorimer S, Majumdar S, Adelroth E, Johnston PW, Rogers AV, Johansson SA, Jeffery PK. Airway and lung elastic fibre is not reduced in asthma nor in asthmatics following corticosteroid treatment. *Eur Respir J.* 1995;8:922-7.

- Gold DR. Environmental tobacco smoke, indoor allergens, and childhood asthma. *Environ Health Perspect.* 2000;108:643-51.
- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74:111-22.
- Gonnella PA, Waldner HP, Kodali D, Weiner HL. Induction of low oral tolerance in IL-10 deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.* 2004;23:193-200.
- Grasemann H, Yandava CN, Drazen JM. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:39-41.
- Greenberg SS, Ouyang J, Zhao X, Giles TD. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. *Nitric Oxide.* 1998;2:203-12.
- Grol MH, Gerritsen J, Vonk JM, Schouten JP, Koeter GH, Rijcken B, Postma DS. Risk factors for growth and decline of lung function in asthmatic individuals up to age 42 years. A 30-year follow-up study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1830-7.
- Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FBJM, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:7809-13.
- Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:852-7.
- Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet.* 1993;342:1510-3.
- Haneda K, Sano K, Tamura G, Sato T, Habu S, Shirato K. TGF- β induced by oral tolerance ameliorates experimental tracheal eosinophilia. *J Immunol.* 1997;159:4484-90.
- Harris RR, Carter GW, Bell RL, Moore JL, Brooks DW. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int J Immunopharmacol.* 1995;17:147-56.
- Hauet-Broere F, Unger WW, Garssen J, Hoijer MA, Kraal G, Samsom JN. Function CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol.* 2003;33:2801-10.
- Hawrylowicz C, Caulfield J, Fernandez M, Richards D, Sousa A, Lane S, Loke TK, Lo R, Corrigan C, O'Connor B, Lee T. Monocytes and macrophages-friend or foe?

Clin Experim Allergy Rev. 2001;1:85-8.

Hedqvist P, Gautam N, Lindbom L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:S117-19.

Henderson Jr. W. The role of leukotrienes in asthma. *Ann Allergy.* 1994;72:272-8.

Heppell LMJ, Kilshaw PJ. Immune responses of guinea pigs to dietary protein. *Int Archs Allergy appl Immun.* 1982;68:54-9.

Hibbs JB, Taintor RR, Vaurin Z. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:6369-73.

Hogaboam CM, Gallinat CS, Bone-Larson C, Chensue SW, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Collagen deposition in a non-fibrotic lung granuloma model after nitric oxide inhibition. *Am J Pathol.* 1998;153:1861-72.

Hogan MB, Weissmam DN, Hubbs AF, Gibson LF, Piktel D, Landreth KS. Regulation of eosinophilopoiesis in a murine model of asthma. *J Immunol.* 2003;171:2644-51.

Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, Richter A, Lackie P, Lordan J, Howarth P. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interaction in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J.* 2003;44:S24-9.

Holgate ST. What does inflammation and airway remodelling mean? *Clin Exp Allergy Rev.* 2001;1:59-61.

Homer RJ, Elias JA. Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med.* 2000;21:331-43.

Huber HL, Koessler KK. The pathology of bronchial asthma. *Arch Int Med.* 1992;30:689-760.

Humbles AA, Conroy DM, Marleau S, Rankin SM, Palframan RT, Proudfoot AEI, Wells TNC, Li D, Jeffery PK, Griffiths-Johnson DA, Williams TJ, Jose PJ. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. *J Exp Med.* 1997;186:601-12.

Hutson PA, Church MK, Clay TP, Holgate ST. Early and late phase bronchoconstriction after allergen challenge of non-anesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137:548-57.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is a nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:9265-9.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*. 2002;53:503-14.

Imasaki T, Kobayashi H, Hataishi R, Hayashi I, Tomita T, Majima M. Nitric oxide is generated in smooth muscle layer by neurokinin A and counteracts constriction in guinea pig airway. *Nitric oxide*. 2001;5:465-74.

International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISSAC. *Lancet*. 1998a;351:1225-32.

International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998b;12:315-35.

Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1:176-83.

Johnson PR, Ammit AJ, Carlin SM, Armour CL, Caughey GH, Black JL. Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *Eur Respir J*. 1997;10:38-43.

Jordana M. Mast cells and fibrosis - who's on first? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8:7-8.

Joubert P, Hamid Q. Role of airway smooth muscle in airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:713-6.

Karlsson MR, Kahl H, Hanson LA, Telemo E, Dahlgren UI. Tolerance and bystander suppression, with involvement of CD25-positive cells, is induced in rats receiving serum from ovalbumin-fed donors. *Immunology*. 2000;100:326-33.

Kato H, Fujihashi K, Kato R, Yuki Y, McGhee JR. Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses. *J Immunol*. 2001;166:3114-21.

Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AMC, Rodriguez D, Russo M. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:283-90.

Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1157-61.

Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9:28-33.

- Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev.* 2005;206:132-48.
- Kenyon NJ, Gohil K, Last JA. Susceptibility to ovalbumin-induced airway inflammation and fibrosis in inducible nitric oxide synthetase-deficient mice: mechanisms and consequences. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;191:2-11.
- Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:454-7.
- Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet.* 1994;343:133-5.
- Kips JC, Cuvelier CA, Powells RA. Effect of acute and chronic inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992;155:1306-10.
- Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl.* 2001;34:S24-33.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:5159-62.
- Koarai A, Ichinose M, Sugiura H, Tomaki M, Watanabe M, Yamagat S, Komaki Y, Shirato K, Hattori T. iNOS depletion completely diminishes reactive nitrogen-species formation after an allergic response. *Eur Respir J.* 2002;20:609-16.
- Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 1994;372:546-8.
- Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Grahnan MF. Cleavage of type I procollagen by humans mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem.* 1997;272:7127-31.
- Kovacs E, DiPietro L. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994;8:854-61.
- Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:1505-10.
- Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1220-5.
- Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB. Eosinophilic and neutrophilic inflammation

- in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92:537-48.
- Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:697-704.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:6348-52.
- Lambert RK, Codd SL, Alley MR, Pack RJ. Physical determinants of bronchial mucosal folding. *J Appl Physiol* 1994;77:1206-16.
- Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IFLC, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strip. *J Appl Physiol*. 2006;100:1610-6.
- Lapa e Silva JR, Bachelet CM, Pretolani M, Baker D, Scheper RJ, Vargaftig BB. Immunopathologic alterations in the bronchi of immunized guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9:44-53.
- Larche M, Robson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:450-63.
- Lazaar AL, Panettieri RA. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:488-95.
- Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β (1). *J Exp Med*. 2001;194:809-21
- Lehtimäki L, Kankaanranta H, Saarelainen S, Turjanmaa V, Moilanen E. Increased alveolar nitric oxide concentration in asthmatic patients with nocturnal symptoms. *Eur Respir J*. 2002;20:841-45.
- Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IFLC. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:145-52.
- Leick-Maldonado EA, Lemos M, Tibério IFLC, Caldini EG, Montes GS, Martins MA, Saldiva PHN. Differential distribution of elastic system fibers in control and bronchoconstricted intraparenchymatous airways in the guinea-pig lung. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1997;29:427-34.
- Leick-Maldonado EA. *Distribuição diferencial das fibras do sistema elástico em vias aéreas intraparenquimatosas normais e broncoconstritas em pulmões de cobaia* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.

- Li CG, Rand MJ. Evidence that part of NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1991;102:919-4.
- Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:229-33.
- Lordan JL, Bucchieri F, Richter A, Konstantinidis A, Holloway JW, Thornber M, Puddicombe SM, Buchanan D, Wilson SJ, Djukanovic R, Holgate ST, Davies DE. Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatics bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2002;169:407-14.
- Lötvall J, Inman M, O'Byrne P. Measurement of airway hyperresponsiveness: new considerations. *Thorax*. 1998;53:419-24.
- Ludwing MS, Shore SA, Fredberg JJ, Drazen JM. Differential responses of tissue viscance and collateral resistance to histamine and leukotriene C4. *J Appl Physiol*. 1988;65:1424-9.
- Lugogo NL, Kraft M. Epidemiology of asthma. *Clin Chest Med*. 2006;27:1-15.
- Lühns H, Papadopoulos T, Schmidt HHHW, Menzel T. Type I nitric oxide synthase in the human lung is predominantly expressed in capillary endothelial cells. *Respir Physiol*. 2002;129:367-74.
- Lundin BS, Dahlgren UIH, Hanson LA, Telemo E. Oral tolerization leads to active suppression and bystander tolerance in adult rats while anergy dominates in young rats. *Scand J Immunol*. 1996;43:56-63.
- Lundin BS, Karlsson MR, Svensson LA, Hanson LA, Dahlgren UIH, Telemo E. Active suppression in orally tolerized rats coincides with in situ transforming growth factor-beta (TGF- β) expression in the draining lymph nodes. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:181-7.
- Lungarella G, Menegazzi R, Gardi C, Spessotto P, de Santi MM, Bertoncin P, Patriarca P, Calzoni P, Zabucchi G. Identification of elastase in humans eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1992;292:128-35.
- Maciel M, Fusaro AE, Duarte AJS, Sato MN. Modulation of IgE and cytokine production in Peyer's patches and draining lymph nodes in sensitized mice made tolerant by oral dust mite administration. *J Interferon Cytokine Res*. 2000;20:1057-63.
- Madison JM. Migration of airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:8-11.

- Madri JA, Graesser D. Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol*. 2000;7:103-16.
- Maia JG, Marcopito LF, Amaral AN, Tavares BF, Lima e Santos FA. Prevalence of asthma and asthma symptoms among 13 and 14-year-old schoolchildren, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2004;38:292-9.
- Maiti PK, Feferman T, Im SH, Souroujon MC, Fuchs S. Immunosuppression of rat myasthenia gravis by oral administration of a syngeneic acetylcholine receptor fragment. *J Neuroimmunol*. 2004;152:112-20.
- Marth T, Zeitz M, Ludviksson B, Strober W, Kelsall B. Murine model of oral tolerance. Induction of Fas-mediated apoptosis by blockade of interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;859:290-4.
- Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J*. 2000;16:346-54.
- Maruo K, Kayashima KI, Ono T. Expression of neuronal nitric oxide synthase in dermal infiltrated eosinophils in eosinophilic pustular folliculitis. *Br J Dermatol*. 1999;140:417-20.
- Matsumoto H, Niimi A, Takemura M, Ueda T, Minakuchi M, Tabuena R, Chin K, Mio T, Ito Y, Muro S, Hirai T, Morita S, Fukuhara S, Mishima M. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax*. 2005;60:277-81.
- Mauad T, Silva LFF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FDC, Martins MA, Saldiva PHN, Dohnnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:857-62.
- Mauad T, Xavier ACG, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:968-75.
- Mautino G, Henriquet C, Jaffuel D, Bousquet J, Capony F. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 level on bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:324-30.
- McCall TB, Palmer RM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol*. 1991;21:2523-7.
- McParland BE, Macklem PT, Paré PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol*. 2003;95:426-34.

- Mehta S, Lilly CM, Rollenhagen JE, Haley KJ, Asano K, Drazen JM. Acute and chronic effects of allergic airway inflammation on pulmonary nitric oxide production. *Am J Physiol*. 1997;272:L124-31.
- Meng QH, Polak JM, Edgar AJ, Chacon MR, Evans TJ, Gruenert DC, Bishop AE. Neutrophils enhance expression of inducible nitric oxide synthase in human normal but not cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J Pathol*. 2000;190:126-32.
- Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:450-5.
- Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer MAM, Macic L, Molendijk N, Zaagsma J. Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol*. 2002;136:391-8.
- Meyer AL, Benson J, Song F, Javed N, Gienapp IE, Goverman J, Brabb TA, Hood L, Whitacre CC. Rapid depletion of peripheral antigen-specific T cells in TCR-transgenic mice after oral administration of myelin basic protein. *J Immunol*. 2001;166:5773-81.
- Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 1997;100:2146-52.
- Min SY, Park KS, Cho ML, Kang JW, Cho YG, Hwang SY, Park MJ, Yoon CH, Min JK, Lee SH, Park SH, Kim HY. Antigen-induced, tolerogenic CD11c⁺, CD11b⁺ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:887-98.
- Moldoveanu Z, Oliver F, Mestecky J, Elson CO. Oral tolerance in humans: failure to suppress an existing immune response by oral antigen administration. *An N Y Acad Sci*. 2004;1029:299-309.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-12.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989;38:1709-15.
- Montefort S, Gratziau C, Gounding D, Polosa R, Haskard DO, Howarth PH, Holgate ST. Bronchial biopsies evidence for leucocyte infiltration and upregulation of leucocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J Clin Invest* 1994;93:1411-21.
- Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996;20:15-27.

- Moreno RH, Hogg, JC, Paré PD. Mechanics of airway narrowing. *Am Rev Respir Dis*. 1986;133:1171-80.
- Mortola JP, Noworaj A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*. 1983; 55:250-3.
- Mosmann TC, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17:138-42.
- Mowat AM, Parker LA, Beacock-Sharp H, Millington OR, Chirido F. Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1029:1-8.
- Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Lafaille MAC. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest*. 2005;115:1923-33.
- Nakajima J, Ono M, Takeda M, Kawauchi M, Furuse A, Takizawa H. Role of costimulatory molecules on airway epithelial cells acting as all antigen presenting cells. *Transplant Proc*. 1997;29:2297-300.
- Nakashima AS, Lanças T, Prado CM, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IFLC. Oral tolerance reduces specific and inespecific lung parenchyma responsiveness in a model of chronic airway inflammation in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169(7): A573. (Presented at 100th International Conference American Thoracic Society; 2004 May 17: Orlando, Florida, USA. Abstract).
- Nakashima AS, Ruiz VC, Tayar FM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Capellozi VL, Martins MA, Tibério IFLC. Modulation of inflammatory cells apoptosis induced by oral tolerance in a model of chronic allergic airway inflammation in guinea pigs. *Eur Resp J*. 2005; 26 (Suppl. 49): 233s. (Presented at European Respiratory Society 15th Annual Congress; 2005 Sep 19-23; Copenhagen, Denmark. Abstract).
- Norman V, Keith CM. Nitrogen oxides in tobacco smoke. *Nature*. 1965;205:915-6.
- O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest*. 2003;123:S411-6.
- O'Byrne PM, Postma DS. The many faces of airway inflammation. *Am J Resp Crit Care Med*. 1999;159:S41-66.
- O'Byrne PM. Cyclooxygenase products. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Woolcock AN. *Asthma*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. v1. p.559-66.
- Offer S, Shoseyov D, Bibi H, Eliraz A, Madar Z. A leukotriene receptor antagonist modulates iNOS in the lung and in a leukotriene-free cell model. *Nitric Oxide*. 2003;9:10-7.

- Oganov RG, Maslennikova GYA. Asthma mortality in Russia between 1980 and 1989. *Eur Respir J*. 1999;13:287-9.
- Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:177-81.
- Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, Isoyama S, Tanno Y, Tamura G, Yamauchi K, Nagura H, Shirato K. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16:212-9.
- Oliveira CR, Taniguchi EA, Fusaro AE, Victor JR, Brito CA, Duarte AJ, Sato MN. Bystander effect in synergy to anergy in oral tolerance of *blomia tropicalis*/ovoalbumin murine co-immunization model. *J Clin Immunol*. 2005;25:153-61.
- Oliveira MA, Muniz MT, Santos LA, Faresi SM, Fernandes ALG. Custo-efetividade de programa de educação para adultos asmáticos atendidos em hospital-escola de instituição pública. *J Pneumol*. 2002;28:71-6.
- Omari TI, Sparrow MP, Mitchell HW. Responsiveness of human isolated bronchial segments and its relationship to epithelial loss. *Br J Clin Pharmacol*. 1993;35:357-65.
- Palframan RT, Collins PD, Severs NJ, Rothery S, Williams TJ, Rankin SM. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med*. 1998;188:1621-32.
- Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:S627-35.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-6.
- Paré PD, Michoud MC, Boucher RC, Hogg JC. Pulmonary effects of acute and chronic antigen exposure of immunized guinea pigs. *J Appl Physiol*. 1979;46:346-53.
- Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2:10-9.
- Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:477-86.
- Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA. Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB J*. 1999;13:1810-6.

- Pauwels R. The relationship between airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy*. 1989;19:395-8.
- Payne DNR, Rogers AV, Ädelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:78-82.
- Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*. 1999;54:268-72.
- Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martins JG, Hamid Q. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Clin Immunol*. 2005;116:544-9.
- Perini A, Mota I. The production of IgE and IgG1 antibodies in guinea-pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharides. *Immunology*. 1973;25:297-305.
- Persson MG, Friberg SG, Hedqvist P, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide counteracts antigen-induced bronchoconstriction. *Eur J Pharmacol*. 1993;249:R7-8.
- Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet*. 1994;343:146-7.
- Phipps S, Benyahia F, Ou TT, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Acute allergen-induced airway remodeling in atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:626-32.
- Poon BY, Raharjo E, Patel KD, Tavener S, Kubes P. Complexity of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003;108:1107-12.
- Postma DS, Kerstjens HAM. Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:S187-92.
- Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005a;288:L741-8.
- Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IFLC. Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005b;289:L677-83.
- Prado CM, Leick-Maldonado ED, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IFLC. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway

inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006. Available from: <http://ajrcb.atsjournals.org/cgi/reprint/200503910cv1>.

Prado CM. *Efeito do óxido nítrico e das fibras nervosas sensíveis à capsaicina na modulação da inflamação crônica de vias aéreas em cobaias* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

Prieto L, Gutiérrez V, Morales C, Marin J. Differences in sensitivity, maximal response and position of the concentration-response curve to methacholine between asthmatics, patients with allergic rhinitis and healthy subjects. *Respir Med*. 1998;92:88-92.

Ragazzo JL, Ozaki ME, Karlsson L, Peterson PA, Webb SR. Costimulation via lymphocyte function-associated antigen 1 in the absence of CD28 ligation promotes anergy of naïve CD4⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:241-6.

Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28:648-54.

Rennard SI, Romberger DJ, Robbins RA, Spurzem JR. Is asthma an epithelial disease? *Chest* 1995;107:127-31.

Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003;58:175-82.

Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84:731-65.

Rio EBM, Gallo PR, Siqueira AAF. Mortalidade por asma no município de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2002;36:146-54.

Rizzo LV, Morawetz RA, Miller-Rivero NE, Choi R, Wiggert B, Chan C, Morse III HC, Nussenblatt RB, Caspi RR. IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J Immunol*. 1999;162:2613-22.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1:520-4.

Rodrigues CM, Martins-Filho OA, Vaz NM, Carvalho CR. Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. *Immunology*. 2006;117:517-25.

Romero PV, Robatto FM, Simard S, Ludwing M. Lung tissue behavior during methacholine challenge in rabbits in vivo. *J Appl Physiol*. 1992;73:207-12.

Ross R. The elastic fiber. *J Histochem Cytochem*. 1973;21:199-208.

- Russo M, Jancar S, Siqueira ALP, Mengel J, Gomes E, Ficker SM, Faria AMC. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. *Immunol Lett*. 1998;61:15-23.
- Russo M, Nahori MA, Lefort J, Gomes E, Keller AC, Rodriguez D, Ribeiro OG, Adriouch S, Gallois V, Faria AMC, Vargaftig BB. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24:518-26.
- Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, Warth MPTN, Zin WA, Saldiva PHN, Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacoline in Wistar rats. *Am J Physiol*. 1995;268:L23-9.
- Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, Hiwada K. Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:126-34.
- Saklayen MG, Pesce AJ, Pollak VE, Michael JG. Kinetics of oral tolerance: study of variables affecting tolerance induced by oral administration of antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984;73:5-9.
- Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax*. 2001;56:902-6.
- Samb A, Pretolani M, Dinh-Xuan A-T, Oukssel H, Callebert J, Lisdero C, Aubier M, Boczkowski J. Decreased pulmonary and tracheal smooth muscle expression and activity of type 1 nitric oxide synthase (nNOS) after ovalbumin immunization and a multiple aerosol challenge in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:149-54.
- Sampson AP. Eosinophils: provokers or bystanders in asthma? *Clin Experim Allergy Rev*. 2001;1:73-6.
- Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*. 1992;79:3101-9.
- Santing RE, Olymulder CG, Zaagsma J, Meurs H. Relationships among allergen-induced early and late phase airway obstructions, bronchial hyperreactivity, and inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93:1021-30.
- Schuiling M, Meurs H, Zuidhof AB, Venema N, Zaagsma J. Dual action of iNOS-derived nitric oxide in allergy-induced airway hyperreactivity in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1442-9.
- Sedgwick JD, Holt PG. Down-regulation of immune response to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. *Immunology*. 1985;56:635-42.

- Senior RM, Connolly NL, Cury JD, Welgus HG, Campbell EJ. Elastin degradation by human alveolar macrophages. A prominent role of metalloproteinase activity. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139:125-6.
- Serhan CN, Takano T, Chiang N, Gronert K, Clish CB. Formation of endogenous "antiinflammatory" lipid mediators by transcellular biosynthesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:S95-101.
- Sheppard MN, Harrison NK. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 1. Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax*. 1992;47:1064-74.
- Shiba K, Kasahara K, Nakajima H, Adachi M. Structural change of the airway wall impair respiratory function, even in mild asthma. *Chest*. 2002;12:1622-6.
- Shore SA, Johnston RA. Obesity and asthma. *Pharmacol Ther*. 2006;110:83-102.
- Siqueira ALP. *Asma experimental: mecanismos de indução e de tolerância imunológica* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.
- Smith KM, Eaton AD, Finlayson LM, Garside P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:S175-8.
- Smith KM, McAskill F, Garside P. Orally tolerized T cells are only able to enter B cell follicles following challenge with antigen in adjuvant, but they remain unable to provide B cell help. *J Immunol*. 2002;168:4318-25.
- Song F, Gienapp IE, Shawler T, Guan Z, Whitacre CC. The thymus plays a role in oral tolerance induction in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1029:402-4.
- Spoelstra FM, Postma DS, Kauffman HF. Mutual activation of pulmonary fibroblasts and eosinophils, and modulation by drugs in relation to asthma. *Clin Exp Allergy*. 2001;31:808-16.
- Sterk PJ, Bel EH. Bronchial hyperresponsiveness: the need for distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. *Eur Respir J*. 1989;2:267-74.
- Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T-lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J*. 1991;5:171-7.
- Sun J, Stalls MA, Thompson KL, Houten NFV. Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction. *Cell Immunol*. 2003;225:33-41.
- Tan PH, Yates JB, Xue SA, Chan C, Jordan WJ, Harper JE, Watson MP, Dong R, Ritter MA, Lechler RI, Lombardi G, George AJ. Creation of tolerogenic human dendritic cells via intracellular CTLA4: a novel strategy with potencial in clinical immunosuppression. *Blood*. 2005;106:2936-43.

- Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S, Komai M, Nagao Y, Takahashi Y, Nagai H. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res*. 2001;50:616-24.
- Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ohmichi M, Abe S. Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:900-5.
- Tanizaki Y, Kitani H, Okazaki M, Mifune T, Mitsunobu F, Kimura I. Effects of long-term glucocorticoid therapy on bronchoalveolar cells in adult patients with bronchial asthma. *J Asthma*. 1993;30:309-18.
- Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell MP, Gleich GJ. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J Exp Med*. 1989;169:1757-69.
- Thurau SR, Chan CC, Nussenblatt RB, Caspi RR. Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:370-6.
- Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1739-47.
- Tibério IFLC. Modelo experimental de inflamação crônica de vias aéreas em cobaias: papel das neurocininas [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1996.
- Tiddens H, Silverman M, Bush A. The role of inflammation in airway disease: remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:S7-10.
- Torseth JW, Gregerson DS. Oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis: feeding after disease induction is less protective than prefeeding. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;88:297-304.
- Trifilieff A, Fujitani Y, Mentz F, Dugas B, Fuentes M, Bertrand C. Inducible nitric oxide synthase inhibitors suppress airway inflammation in mice through down-regulation of chemokine expression. *J Immunol*. 2000;165:1526-33.
- Tschumperlin DJ, Drazen JM. Mechanical stimuli to airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;64:S90-4.
- Tsuchiya T, Nishimura Y, Nishiuma T, Kotani Y, Funada Y, Yoshimura S, Yokoyama M. Airway remodeling of murine chronic antigen exposure model. *J Asthma*. 2003;40:935-44.

- Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest*. 2003;111:1065-72.
- Ushiqui T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol*. 2002;65:109-26.
- VanOosterhout AJ, Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur Respir J*. 2005;26:918-32.
- Varner AE, Lemanske RF Jr. The early and late response to allergen. In Busse WW, Holgate ST, *Asthma and Rhinitis*. 2nd ed. London: Blackwell Science, 2000:1172-85.
- Verdolin BA, Ficker SM, Faria AMC, Vaz NM, Carvalho CR. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34:211-9.
- Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, Bellia V, Bousquet J, Bonsignore G. Increased levels of elastase and alpha 1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998b;157:505-11.
- Vignola AM, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Scichilone N, Spatafora M, Bousquet J, Bonsignore G, Bellia V. Effect of age asthma duration upon elastase and α 1-antitrypsin levels in adults asthmatics. *Eur Respir J*. 2003b;22:795-801.
- Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor- β expression in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:591-99.
- Vignola AM, Chiappara G, Siena L, Gagliardo R, Chanez P, Bousquet J. Fibroproliferative response in matrix deposition. *Clin Expir Allergy Rev*. 2001;2:111-5.
- Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjemarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003a;123:S417-22.
- Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 rates correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998a;158:1945-50.
- Vizzard MA, Erdman SL, De Groat WC. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in dorsal root ganglion neurons after systemic capsaicin administration. *Neuroscience*. 1995;67:1-5.
- Von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:9-10.

- Wall AF, He S, Buckley MG, McEuen AR. Roles of the mast cell and basophil in asthma. *Clin Experim Allergy Rev.* 2001;1:68-72.
- Warth MPTN, Maldonado EAL, Fernezlian SM, Leme AS, Perini A, Saldiva PHN, Martins MA. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Am J Physiol.* 1995;268:L781-8.
- Warth MPTN. *Participação das neurocininas na resposta pulmonar aguda à inalação de antígenos* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1994.
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organ. *Lab Invest.* 1963;12: 31-55.
- Weiner HL. Current issues in the treatment of human diseases by mucosal tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1029:211-24.
- Weiner HL. Oral tolerance, an active immunologic process mediated multiple mechanisms. *J Clin Invest.* 2000;106:935-7.
- Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med.* 1991;324:1110-18.
- Wenzel SE, Larsen GL, Johnston K, Voelkel NK, Westcott JY. Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis.* 1994;142:112-9.
- Wenzel SE. The significance of the neutrophil in asthma. *Clin Experim Allergy Rev.* 2001;1:89-92.
- White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;3:S378-1.
- Widdicombe JG. Autonomic regulation i-NANA/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:S171-5.
- Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:255-81.
- Wilson DH, Adams RJ, Tucker G, Appleton S, Taylor AW, Ruffin R. Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990-2003. *Med J Aust.* 2006;184:226-9.
- Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Expir Allergy.* 1997;27:363-71.
- Winkler B, Baier K, Wagner S, Repa A, Eichler HG, Scheiner O, Kraft D, Wiedermann U. Mucosal tolerance as therapy of type I allergy: intranasal application of recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen, leads to the suppression of allergic immune responses and airway inflammation in sensitized mice. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:30-6.

- Woodruff PG, Dolganov GM, Ferrando RE, Donnelly S, Hays SR, Solberg OD, Carter R, Wong HH, Cadbury PS, Fahy JV. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without change in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:1001-6.
- Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256:225-8.
- Yamauchi K. Airway remodeling in asthma and its influence on clinical pathophysiology. *Tohoku J Exp Med*. 2006;209:75-87.
- Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, Whiteley HE, Thrall RS. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol*. 1999;154:1911-21.
- Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for Th2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and Th1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12:477-87.
- Zemann B, Schwaerzler C, Griot-Wenk M, Nefzger M, Mayer P, Schneider H, Weck A, Carballido JM, Liehl E. Oral administration of specific antigens to allergy-prone infant dogs induces IL-10 and TGF- β expression and prevents allergy in adult life. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1069-75.
- Zhang S, Smartt H, Holgate ST, Roche WR. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest*. 1999;79:395-405.
- Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL. Activation of CD25+CD4+ regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol*. 2001;167:4245-53.
- Zhu Z, Lee CG, Zheng T, Chupp G, Wang J, Homer RJ, Noble PW, Hamid Q, Elias JA. Airway inflammation and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:S67-70.
- Zu Y, Li CR, Zheng YJ, Deng JK, Fu XL. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in the pathogenesis of asthma in children. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86:35-8.
- Zucker-Franklin D, Grusky G. The identification of eosinophil colonies in soft-agar cultures by differential staining peroxidase. *J Histochem Cytochem*. 1976;24:1270-2.