FLÁVIA CASTRO RIBAS DE SOUZA

Efeitos dos tratamentos com glicocorticóides, com antagonista do receptor do cisteinil-leucotrieno D_4 e com o inibidor específico da iNOS na resposta inflamatória e de remodelamento no tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação pulmonar crônica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Flávia Castro Ribas de
Efeitos dos tratamentos com glicocorticóides, com antagonista do receptor do cisteinil-leucotrieno D4 e com o inibidor específico da iNOS na resposta inflamatória e de remodelamento no tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação pulmonar crônica / Flávia Castro Ribas de Souza. -- São Paulo, 2011.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

Descritores: 1.Asma 2.Inflamação alérgica crônica 3.Estresse oxidativo 4.Anti-leucotrienos 5.Glucocorticóides

USP/FM/DBD-386/11

Dedico este trabalho a todos os

pacientes asmáticos e espero que

um dia as crises possam ser

atenuadas.

AGRADECIMENTOS

Creio que esta parte de agradecimentos é uma tarefa difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças e por esquecimento não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para o trabalho, pois nada na vida conquistamos sozinhos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Acredito que qualquer trabalho científico só se realiza com a dedicação de um grupo de pessoas, e este não foi diferente De uma maneira geral gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma participaram de alguma etapa para a realização deste trabalho.

Primeiramente devo agradecer a minha orientadora, pela oportunidade que me foi dada e pelo bom convívio. Com ela tive o prazer e enriquecer meu conhecimento. Com sua tutoria intelectual e exemplo de professora apaixonada pelo que faz, ela serve de inspiração para seus alunos. Não posso me esquecer das nossas terapias vespertinas nas sextas feiras...

Ao professor Mílton, que me recebeu de braços abertos tanto no laboratório como funcionária da clínica médica.

À Fabiana que me auxiliou no início do trabalho com as mecânicas que duravam horas e teve a paciência de me ensinar todo o funcionamento da máquina de micromecânica.

À Nathália, pois desde o início estamos juntas nos alternando e trocando algumas figurinhas.

Às funcionárias do LIM-20 Clarisse, Bia e Fernanda que estão sempre dispostas a nos ajudar.

À Carla Prado e Edna pelos auxílios nos fins de semana e horários pouco convencionais.

À Rosana pelo auxílio com a burocracia e pelos sábios conselhos.

À Elaine e Rose, que me sempre me orientam, me colocam na linha, me aturam e dividem o ambiente de trabalho comigo.

À minha eterna estagiária Mariana que nessa reta final me ajudou muito com os atendimentos dos meus pacientes, além de aguentar o estresse da fase final.

À minha eterna professora, mãe, amiga Solange Bricola, se não fosse por ela tenho certeza que nada disso estaria acontecendo. Lembro me como se fosse hoje a nossa conversa no refeitório... Obrigada!

À toda equipe de médicos da clínica geral, Liginha com sua competência e ombro amigo e Rafaela que chegou com todo gás nos 40 minutos do segundo tempo e me ajudou com as traduções... nem tenho como agradecer.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP- pelo apoio financeiro, o que possibilitou que eu desenvolvesse o trabalho.

Ao LIM-20 por fornecer uma excelente infra-estrutura, o que possibilitou realizar os experimentos.

Aos meus maravilhosos pais e irmão que são meu alicerce e meu porto seguro, eles sempre me compreendem e me apoiam.

Por último e não menos importante, Deus, meu anjo protetor, por me permitir caminhar até onde me encontro, foram dificuldades e conquistas quem me fizeram aprender e amadurecer, superando sempre os obstáculos por mais impossíveis que eles pudessem parecer.

Muito obrigada!!!

"A mente que se abre a uma ideia, jamais voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

RESUMO

Efeitos dos tratamentos com glicocorticóides, com antagonista do receptor do cisteinil-leucotrieno D_4 e com o inibidor específico da iNOS na resposta inflamatória e de remodelamento no tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação pulmonar crônica. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: Estima-se que 10% dos doentes com asma têm sintomas e limitações importantes, como exacerbações freqüentes ou redução persistente da função respiratória As alterações do parênquima pulmonar distal tem sido recentemente abordadas na fisiopatologia da asma. Apesar do uso de corticosteróides, pacientes com asma refratária têm mais estresse oxidativo, assim como apresentam ativaçao da iNOS. Além disso, muitos dos dispositivos utilizados para administração de esteróides inalatórios geram partículas que não chegam efetivamente às vias aéreas distais e ao parênquima pulmonar. **Objetivos:** Avaliamos os efeitos do tratamento com montelucaste ou dexametasona tratamentos associados ou não a um inibidor específio da iNOS (1400W) na resposta eosinofílica, remodelamento da matriz extracelular, estresse oxidativo, conteúdo de actina, células positivas para IL4, IL5, MMP9, TIMP1, IFNγ, TGFβ do parênquima em cobaias com inflamação crônica pulmonar. **Métodos:** As cobaias foram inaladas com ovalbumina (grupo OVA) 2X/semana por 4semanas. Após a 4ª inalação, as cobaias foram tratadas diariamente com montelucaste (grupo OVAM 10mg/Kg/PO/dia) ou dexametasona (grupo OVAD 5mg/Kg/IP/dia). O inibidor da iNOS, 1400W (grupo OVAW 1mg/kg/dia) foi administrado

intraperitonealmente nos últimos 4 dias (OVAW, OVADW e grupos OVAMW). Após 72 horas da 7ª inalação, as cobaias foram anestesiadas, e os fragmentos de tecido pulmonar distal foram submetidos à avaliação histopatológica. **Resultados:** Houve um aumento no infiltrado eosinofílco, nas células positivas para IL4, IL5, TIMP1, MMP9, iNOS, IFNγ TGFβ, conteúdo de actina, isoprostano PGF2 alfa, fibras colágenas e elásticas nos animais OVA em comparação com animais SAL ($p<0,05$). Houve uma diminuição no número de eosinófilos, células positivas para IL4, IL5, MMP9, TIMP1, IFNγ, TGFβ, conteúdo de actina, colágeno e isoprostano PGF2 alfa em todos os grupos tratados em comparação com animais OVA ($p<0,05$). O conteúdo de fibras elásticas foram reduzidas somente nos grupos OVAMW, OVADW e OVAW em comparação com animais OVA ($p<0,05$). A associação de 1400W e o tratamento com montelucaste (grupo OVAMW) potencializou a redução do conteúdo de actina, fibras elásticas, isoprostano PGF2 alfa de células positivas para IL4, IL5, TIMP1, IFNγ TGFβ e iNOS em relação ao grupo montelucaste (OVAM) ($p<0,05$). Os tratamentos com 1400W e dexametasona (grupo OVADW) contribuíram para uma maior redução do conteúdo das fibras elásticas, actina e isoprostanoPGF2 alfa e o número de células positivas para IL4, IL5, IFNγ e TIMP1 em relação ao grupo dexametasona (OVAD) ($p<0,05$). **Conclusões:** O tratamento com corticosteróides associados à inibição da iNOS contribuiu para uma maior redução da remodelação da matriz extracelular, diminuiu o estresse oxidativo, e também foi eficiente para atenuar a resposta inflamatória Th2 no parênquima pulmonar distal. Por outro lado, o tratamento com montelucaste

associado à inibição da iNOS mostrou uma maior eficácia para reduzir o teor de fibras elásticas, a ativação do estresse oxidativo, conteúdo de actina e expressão das células positivas para IL4, IL5 no parênquima pulmonar distal. Estas associações podem representar futuras ferramentas farmacológicas para o controle das alterações histopatológicas pulmonares distais induzidas pela inflamação crônica.

Palavras chave: Asma, Inflamação alérgica crônica, Estresse oxidativo, Anti-leucotrienos, iNOS, Glicocorticóides

SUMMARY

SOUZA, FCR. Efects of treatment with glucocorticoids, associated with cisteinil-leukotriene D_4 antagonist and specific iNOS inhibitor in inflammatory response and remodeling in pulmonary tissue of chronic pulmonary inflammation model. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: It is estimated that 10% of asthma patients have symptoms and important limitations such as frequent exacerbations or persistent reduction of resiratory function, despite the use of corticosteroids. The alterations of distal lung parenchyma have been recently evaluated on asthma pathophysiology, particulary in patients with refractory asthma and difficcult to control. These patients have increased oxidative stress responses, mainly with significant activation of iNOS. **Aims:** We evaluated the effects of montelukast or dexamethasone treatments associated or not to an iNOS inhibitor (1400W) on eosinophilic response, extracellular matrix remodeling, oxidative stress, actin content, IL4, IL5, MMP9, TIMP1, IFN gama, TGF beta positive cells of distal lung parenchyma in guinea pigs with chronic alergic inflammation. **Methods:** Guinea Pigs were inhaled with ovalbumin (OVA group) twice a week for four weeks. After 4th inhalation, GP were treated with montelukast (OVAM group-10mg/Kg/PO/day) or dexamethasone (OVAD group-5mg/Kg/IP/day). The treatment with iNOS inhibitor 1400W (OVAW group-1mg/kg/day) was given daily in the last 4 days (OVAW, OVADW and OVAMW groups). After 72 hours of 7th inhalation, GP were anesthetized, lung strips were retired and submitted to histopathological

evaluation. **Results:** There was an increase in eosinophilic infiltrate, in the number of positive cells for IL4, IL5, TIMP1, MMP9, iNOS, IFN gama TGF beta, actin, isoprostane PGF2 alpha, elastic and collagen fiber contents in OVA animals comparing to SAL group ($p<0,05$). There was a decrease in the number of eosinophils, IL4, IL5, MMP9, TIMP1, IFN gama, TGF beta positive cells, collagen, actin and isoprostane PGF2 alpha content in all treated groups compared to OVA animals ($p<0.05$), but the treatment with montelukast did not reduce the positive cells for IFN gama, compared to OVA ($p>0.05$). Elastic fiber content were reduced only in OVAMW, OVADW and OVAW groups compared to OVA animals ($p<0.05$). The association of 1400W and montelukast treatments potentiated the reduction of actin, elastic fibres and isoprostane PGF2 alpha contents and the number of IL4, IL5, TIMP1, IFN gama, TGF beta and iNOS positive cells compared to montelukast group ($p<0.05$). The treatments with 1400W and dexamethasone contributed to a greater reduction of elastic fibers, actin and isoprostane PGF2 alpha contents and the number of IL4, IL5, IFNgama and TIMP1 positive cells compared to dexamethasone group ($p<0.05$). **Conclusions:** Corticosteroid treatment associated to iNOS inhibition contributes to a greater reduction of extracellular matrix remodeling, decreases the oxidative stress, and also is efficient to attenuate the Th2 inflammatory response in distal lung parenchyma. On the other hand, montelukast treatment associated to iNOS inhibition showed a higher efficacy to reduce elastic fibres content, oxidative stress activation, actin content and IL4 and IL5 expression in distal lung parenchyma. These associations may

represent future pharmacological tools for controlling distal pulmonary histopathological alterations induced by chronic inflammation.

Keywords: Asthma, Chronic allergic inflammation, Oxidative stress, Anti-leukotrienes, iNOS, Glucocorticoids

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Comitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações e monografias / elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação – DBD/FMUSP, 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de abreviaturas

1. INTRODUÇÃO..... 01

1.1 Aspectos gerais: Definição..... 02

1.2 Epidemiologia..... 02

1.3 Fisiopatologia..... 03

1.4 O óxido nítrico..... 10

1.4.1 Inibidores das óxido nítrico sintases..... 14

1.5 O Papel do Parênquima na Fisiopatogenia da Asma..... 16

1.6 Asma grave..... 21

1.7 Abordagens terapêuticas..... 25

1.7.1 Anti-leucotrienos..... 25

1.7.2 Glicocorticóides..... 28

1.7.3 Anti iNOS..... 29

1.8 Modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica..... 30

1.9 Justificativa do estudo..... 31

2. OBJETIVOS..... 33

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 35

3.1 Grupos Experimentais..... 36

3.2 Protocolo de Sensibilização..... 37

3.2.1 Tratamento com corticosteróide..... 38

3.2.2 Tratamento com montelucaste sódico..... 38

3.2.3 Tratamento com 1400W (inibidor específico da enzima óxido nítrico sintase induzida – iNOS)..... 39

3.3 Estudo Morfométrico..... 39

3.3.1 Quantificação de Eosinófilos..... 40

3.3.2 Coloração de Picro-Sírius..... 40

3.3.3 Coloração de Resorcina-Fucsina..... 41

3.3.4 Avaliação Imunohistoquímica..... 42

3.4 Análise Estatística..... 44

4. RESULTADOS..... 46
4.1 Avaliação da proporção de estruturas..... 47
4.2 Avaliação da densidade de eosinófilos..... 48
4.3 Avaliação de células positivas para IL4 no septo alveolar..... 49
4.4 Avaliação de células positivas para IL5 no septo alveolar..... 50
4.5 Avaliação de células positivas para IFNγ no septo alveolar..... 51
4.6 Avaliação do conteúdo de fibras colágenas e de fibras elásticas no septo alveolar..... 52
4.7 Avaliação de células positivas para TIMP1 no septo alveolar..... 54
4.8 Avaliação de células MMP9 positivas para no septo alveolar..... 55
4.9 Avaliação de células positivas para TGFβ no septo alveolar.... 56
4.10 Avaliação de células positivas para iNOS no septo alveolar..... 57
4.11 Avaliação da proporção de volume de Actina no septo alveolar... 58
4.12 Avaliação da proporção de volume de Isoprostano no septo alveolar..... 59
4.13 Análise descritiva dos fragmentos de tecido pulmonar periférico..... 60
5. DISCUSSÃO..... 64
6. CONCLUSÕES..... 84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Gráfico de barras representando a média ± EP da densidade de eosinófilos..... 48

Figura 2- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para IL4..... 49

Figura 3- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para IL5..... 50

Figura 4- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para IFNγ..... 51

Figura 5- Gráfico de barras representando a média ± EP da porcentagem de fibras colágenas..... 52

Figura 6- Gráfico de barras representando a média ± EP da porcentagem de fibras elásticas..... 53

Figura 7- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para TIMP1..... 54

Figura 8- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para MMP9..... 55

Figura 9- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para TGFβ..... 56

Figura 10- Gráfico de barras representando a média ± EP de células positivas para iNOS..... 57

Figura 11- Gráfico de barras representando a média ± EP da proporção do volume de actina..... 58

Figura 12- Gráfico de barras representando a média ± EP da proporção do volume de isoprostano PGF2 alfa..... 59

Figura 13- Fotomicrografias representativas do conteúdo de isoprostano PGF2 alfa, actina, fibras colágenas e elásticas..... 61

Figura 14- Fotomicrografias representativas da densidade de eosinófilos, células positivas para iNOS, TGFβ e

IFNγ..... 62
Figura 15- Fotomicrografias representativas de células positivas para IL4, IL5, MMP9 e TIMP1..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS

ATS	Sociedade Torácica Americana
CAT	Transporte aminoácido catiônico
CCR	Receptor de glicocorticóide
COX	Ciclooxigenase
DAB	Diaminobenzidina
Datasus	Banco de dados do sistema único de saúde
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPO	Peroxidase eosinofílica
GINA	Global Initiative National of Asthma
Grupo OVA	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina
Grupo OVAD	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com dexametasona
Grupo OVADW	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com dexametasona e 1400W
Grupo OVAM	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com montelucaste
Grupo OVAMW	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com montelucaste e 1400W
Grupo OVAW	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com 1400W
IFN-gama	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucinas
i-NANC	Inibitória não-adrenérgica e não-colinérgica
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LIM-20	Laboratório de investigação médica
L-NAME	L-NG-nitroarginina metil ester

LTD_4	Leucotrieno D_4
LTE_4	Leucotrieno E_4
MDT	Proteína básica principal
MMPs	Metaloproteinases
NIH	National Institute of Health
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOex	Óxido nítrico exalado
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão fosfatada
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF-β_1	Fator transformador do crescimento-Beta
TIMPs	Inibidor das metaloproteinases
VEF_1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS: DEFINIÇÃO

Segundo a *Global Initiative National of Asthma* (GINA, 2010) a definição da asma é baseada em consequências funcionais da inflamação das vias aéreas: "*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 de vias aéreas que tem como consequência episódios recorrentes de sibilos, dispneia, 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*".

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde de 100 a 150 milhões de pessoas no mundo têm diagnóstico de asma brônquica (WHO, 2000). Estima-se que 180.000 pessoas morrem de asma por ano no mundo. De janeiro a agosto de 2011**,** no Brasil, as crises asmáticas foram responsáveis por 158 óbitos (Datasus), sendo que 180 destes ocorreram no Estado de São Paulo.

Considerando as internações tendo como asma a causa principal, foram contabilizadas, no mesmo período, pelo SUS**,** 121.331 em nível nacional, que geraram um custo de R$ 64.429.750,43. Mais de 50% destas internações

(61.811) ocorreram em crianças de 0 a 10 anos, com 23 óbitos, sendo que crianças com asma faltam três vezes mais na escola comparativamente às que não têm este diagnóstico (Fowler et al., 1992; Amorim, Daneluzzi, 2001).

A asma acomete adultos jovens, em faixa etária economicamente ativa, sendo responsável pela perda de três milhões de dias de trabalho por ano nos Estados Unidos. Por acometer faixa etária escolar e economicamente ativa, tem alto impacto social e econômico, com perda de produtividade e participação reduzida na vida familiar, portanto, um problema de saúde pública que gera alto custo com medicações e internações de pacientes. (Daneluzzi, 2001)

1.3 FISIOPATOLOGIA

A inflamação crônica é o fator fisiopatogênico mais importante da asma. Ocorre o recrutamento e ativação de células inflamatórias como os mastócitos, os eosinófilos e os linfócitos de classe Th2. A inflamação presente na resposta asmática contribui para a hiper-responsividade das vias aéreas, desempenhando papel fundamental na limitação ao fluxo aéreo, na contração do músculo liso brônquico, no edema de vias aéreas e no aumento na produção de muco, que caracterizam a fase tardia.

Episódios recorrentes de inflamação crônica podem levar ao remodelamento das vias aéreas e contribuir para que não ocorra reversibilidade na obstrução ao

fluxo de ar em vias aéreas (Tiddens et al., 2000). São características do remodelamento pulmonar, descamação epitelial das vias aéreas, alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, como as fibras colágenas e elásticas, o espessamento da membrana basal, a hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa e epitelial, a elevação do número de células caliciformes e das glândulas submucosas (Kumar, 2001).

Diversos mediadores inflamatórios são liberados pelos mastócitos brônquicos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), pelos macrófagos (fator de necrose tumoral TNF alfa, IL6, óxido nítrico), pelos linfócitos T (IL2, IL3, IL4, IL5, IL13 e fator de crescimento de colônia de granulócitos GM-CSF), pelos eosinófilos (MBP, ECP, EPO, mediadores lipídicos e citocinas), pelos neutrófilos (elastase) e pelas células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos, óxido nítrico). Estes mediadores atuam na manutenção da inflamação e, portanto, no remodelamento pulmonar.

O mecanismo de deposição de matriz extracelular parece ser dependente de um balanço entre sua síntese e sua degradação. A deposição de colágeno no tecido é controlada pelo balanço entre a ativação das metaloproteinases de matriz (MMPs) que degradam colágeno e outros componentes da matriz extracelular e seus inibidores, conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). A MMP2 (colagenase A), a MMP3 (estromeolisina), MMP9 (gelatinase B) e a MMP12 (metaloelastase) estão aumentadas em asmáticos, embora a MMP9 pareça ser a principal (Kelly, Jarjour, 2003; Tagaya,

Tamaoki, 2007), estando aumentada no sangue, no fluido do lavado broncoalveolar, no escarro e em biópsias de asmáticos (Atkinson, Senior, 2003).

As metaloproteinases de matriz estão aumentadas em doenças pulmonares nas quais ocorre remodelamento de vias aéreas como na asma. Suas ações catalíticas dependem da clivagem de um predomínio e da presença de um sítio de ligação ao zinco. Podem ser classificadas conforme a proteína a ser clivada como colagenases, gelatinases ou estromeolisinas e conforme a sua localização, como por exemplo, MMP de superfície celular.

No pulmão, a MMP9 pode ser produzida por diversas células inflamatórias (Ohno et al., 1997; Kelly et al., 2000; Atkinson, Senior, 2003; Ohbayashi, Shimokata, 2005) e pode ativar mecanismos de reparo inadequados como a ativação da produção de TGF beta1 (fator transformador do crescimento beta), aumentando a síntese de colágenos pelos fibroblastos que, por sua vez, estimula os processos fibróticos (Lee et al., 2001).

Na asma ocorre além da fibrose subepitelial, um aumento do número de miofibroblastos, que parecem possuir capacidade de migração e maior contratilidade após a broncoprovocação, sugerindo uma importância do miofibroblastos na patogênese da asma. Além de produzirem colágeno, os miofibroblastos ativados podem ainda contribuir com a inflamação, produzindo diferentes tipos de citocinas e quimiocinas (Spoelstra et al., 2001).

Os fibroblastos são frequentemente encontrados no tecido conectivo. São responsáveis pela produção de uma variedade de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, reticulares e elásticas, laminina, fibronectina, ácido hialurônico, glicoproteínas da substância extracelular amorfa e proteoglicanos (Sheppard, Harrison, 1992; Spoelstra et al., 2001). A membrana basal forma uma barreira entre o meio externo e o epitélio de um lado e o interstício do outro. Isto só é possível pela presença dos componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos (Roche et al., 1989). A alteração no comportamento do fibroblasto parece ser fator imprescindível para que ocorra o remodelamento.

No processo de remodelamento que ocorre na asma brônquica, diversos eventos podem ser observados, como hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa das vias aéreas (Ebina et al., 1993), aumento das glândulas mucosas, espessamento da membrana basal, aumento no número de células claras no epitélio das vias aéreas (Laitinen et al., 1993), alteração dos componentes da matriz extracelular, maior número de miofibroblastos com aumento na deposição de colágeno, aumento no número de vasos sanguíneos e alterações estruturais no tecido pulmonar periférico, ocorrendo também um aumento de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores específicos (Roche et al., 1989).

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 TIMP1 possa ocorrer na fase tardia deste processo (Chiappara et al., 2001; Vignola et al., 2003).

Após ativação de várias células inflamatórias, como mastócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos, pode ocorrer a formação de radicais livres de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila). O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reativas de nitrogênio (RNS) é responsável por vários efeitos deletérios nas vias aéreas, induzindo diversas condições patológicas (Wood et al., 2003; Ricciardolo et al., 2004). Este aumento pode ocorrer quando as células das vias aéreas e os tecidos são expostos ao estresse oxidativo desencadeado pelo contato com poluentes ambientais, infecções, reações inflamatórias exacerbadas ou em situações nas quais os sistemas antioxidantes do organismo estão diminuídos.

O contato destes agentes oxidantes com a membrana celular leva à peroxidação da membrana celular lipídica, que é responsável pela geração de uma série de compostos ativos, análogos às prostaglandinas, conhecidas como isoprostanos, recentemente descobertas (Morrow et al., 1990). Os isoprostanos possuem potente atividade biológica e geralmente mediam certos aspectos da lesão oxidativa. A via de formação dos isoprostanos fornece um mecanismo para a geração de várias classes de isoprostanos provenientes do ácido araquidônico, independentes da via da ciclooxigenase (COX), onde os isômeros F2-isoprostano se destacam, pois foi a primeira classe de isoprostanos descoberta (Milne et al., 2008).

As classes diferem em relação aos grupos funcionais nos anéis prostanos. Esta via tem o potencial de formar 64 estruturas isômeras, sendo o isoprostano PGF2 alfa um dos membros mais característicos da classe F2-isoprostano (Lawson et al., 1999). A atividade biológica do isoprostano PGF2 alfa tem sido investigada em vários sistemas demonstrando efeitos de vasoconstrição e de broncoconstrição em pulmões isolados de ratos (Kang et al., 1993). No pulmão, é possível detectar isoprostanos em células epiteliais, em macrófagos, no colágeno ao redor das vias aéreas e vasos, também no músculo liso de vias aéreas e vasos (Talati et al., 2005).

Os níveis normais de F2-isoprostanos têm sido definidos em humanos saudáveis (Fam, Morrow, 2003; Milne et al., 2007), sendo de relevância a avaliação do papel dos efeitos dos oxidantes endógenos nas doenças, assim como determinar o quanto intervenções terapêuticas relacionadas ao estresse oxidativo podem interferir na evolução fisiopatológica destes agravos. Foi sugerido que os isoprostanos podem atuar como potentes constritores do músculo liso (Kawikova et al., 1996), os quais são produzidos no tecido das vias aéreas e podem contribuir com os efeitos físicos observados durante a resposta tardia na asma, existindo relação da gravidade da doença com a concentração de isoprostano PGF2 alfa no ar exalado (Montuschi et al., 1999).

Quando comparados aos indivíduos saudáveis, estudos demonstram a elevada peroxidação lipídica na asma, mensurada pelo isoprostano PGF2 alfa, sendo que sua concentração está aumentada em 3-4 vezes em asmáticos persistentes (Wood et al., 2000). O aumento de isoprostanos no lavado

broncoalveolar e na urina após desafio com alérgeno representa uma evidência que as ROS e a peroxidação lipídica têm papel fisiopatológico significativo. Além disso, o aumento da concentração de isoprostanos no lavado broncoalveolar, 24 horas após o desafio alérgeno, fornece evidência direta de que os mesmos são produzidos no tecido das vias aéreas e podem contribuir com os efeitos físicos observados durante a resposta tardia da asma (Milne et al., 2008).

O papel dos leucotrienos na fisiopatologia da asma tem sido intensamente investigado nos últimos anos, já que suas atividades biológicas produzem alterações que se assemelham às encontradas na asma humana. Os leucotrienos cisteínicos LTD_4 e LTE_4 possuem propriedades quimiotáticas potentes e específicas para eosinófilos. Além disso, em humanos, os leucotrienos cisteínicos são potentes secretagogos, induzem a secreção de muco e reduzem a motilidade ciliar respiratória, o que reduz o transporte mucociliar (Marom et al., 1982; Bisgaard, Pedersen, 1987; Bisgaard, 2001). Em controles de pacientes asmáticos a inalação de LTC_4 e LTD_4 causa broncoconstrição, com LTD_4 sendo 1000 vezes mais potente do que a histamina (Barnes et al., 1984). O ciclo celular e a proliferação tanto de músculo liso como de várias células hematopoiéticas também podem ser estimulados pelos leucotrienos (Wenzel et al., 1995; Liu et al., 1996; Horwitz et al., 1998).

O LTB_4 estimula a migração de neutrófilos, promovendo a adesão destas células ao endotélio através da ativação da expressão de integrinas; com consequente passagem através da barreira alvéolo-capilar e associado ao aumento da permeabilidade microvascular (VanderMeer *et al.,* 1995; Jancar S et

al., 2001). Este processo induz à redução da integridade da barreira, extravasamento de líquido e proteínas plasmáticas e consequente formação de edema. O LTB_4 também estimula a ativação de neutrófilos, levando à degranulação e liberação de outros mediadores, enzimas e espécies reativas de oxigênio (Busse WW, 1998). Há evidências de que este mediador possa aumentar a permeabilidade microvascular através de uma ação direta sobre células endoteliais, independente de neutrófilos (Burgess CA et al., 1990).

1.4 O ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira que exerce papel significativo em muitos processos fisiológicos e patológicos, além de regular várias funções em células e tecidos, como vasodilatação, neurotransmissão e processos imunológicos (Ricciardolo, 2003; Ricciardolo et al., 2004). Na patogênese da asma brônquica, é sabida a participação do NO, porém seu papel na inflamação ainda tem sido alvo de diversos estudos. O NO atua como neurotransmissor do sistema i-NANC (componente inibitório do sistema não-adrenérgico não-colinérgico) com ação relaxante sobre o músculo liso das vias aéreas (Ricciardolo, 2003), podendo ser encontrado em abundância no sistema nervoso central e periférico (Knowles RG et al., 1989), e como neurotransmissor clássico na regulação da motilidade gastrointestinal, do fluxo sanguíneo regional e da função neuroendócrina.

O NO é gerado a partir da quebra do grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina por meio de oxidação enzimática (Moncada et al., 1989; Tayeh, Marletta, 1989; Ignarro, 2002), onde ocorre a liberação do NO e da L-citrulina. (Culotta E, Koshland DE, 1992; Moncada S, Higgs A, 1993). A L-arginina, precursora de NO, é transportada para dentro das células, via sistema de transporte aminoácido catiônico (CAT) e pode ser metabolizada por dois grupos distintos de enzimas: as óxido nítrico sintases (NOS) e as arginases I e II. Em pacientes asmáticos, o NO é encontrado em altas concentrações e é derivado da enzima NO sintase induzida (iNOS), a qual está presente em várias células inflamatórias, determina hiperemia, edema e exsudação, contribuindo para o estreitamento da luz das vias aéreas nestes pacientes (Ricciardolo et al., 2004).

As óxido nítrico sintases convertem a L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina utilizando a NG-hidroxil-L-arginina como intermediário, que por sua vez diminui a atividade das arginases. A L-citrulina pode ser convertida pelo argininosucinato em L-arginina, enquanto as arginases têm a capacidade de metabolizar a L-arginina em L-ornitina (Ricciardolo et al., 2004). Este processo requer oxigênio como um co-substrato e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como fonte de elétrons para transformar a L-arginina em L-citrulina e assim liberar o óxido nítrico (Ricciardolo et al., 2004). Funcionalmente, existem em três tipos de isoformas das enzimas óxido nítrico sintases, sendo duas delas constitutivas e uma induzida: a isoforma neuronal ou tipo I (nNOS) (Bredt, Snyder,1989; Bredt et al., 1990), a isoforma induzida ou tipo II (iNOS) e a

isoforma endotelial ou tipo III (eNOS) (Xie et al., 1992; Hamid et al., 1993**;** Lamas et al., 1992, Prado et al., 2010).

As isoformas constitutivas (nNOS e eNOS) estão expressas nas vias aéreas (Fischer A et al.,1993; Hamid Q et al., 1993; Kobzik L et al., 1993) e presentes normalmente em situações fisiológicas. Tais enzimas são cálcio-dependentes, capazes de produzir baixas quantidades de óxido nítrico. A isoforma eNOS produz óxido nítrico no endotélio vascular sob condições basais e apesar de sua expressão ser restrita às células endoteliais vasculares, existem relatos da sua localização no hipocampo, sendo sua expressão em humanos significativamente suprimida pela hipóxia (Wong AG et al., 1996).

A isoforma nNOS está presente, principalmente nos neurônios (Vizzard MA et al., 1995) e nervos, porém já foi encontrada na musculatura lisa das vias aéreas (Patel et al., 1999), nas células epiteliais (Asano M et al., 1994) e em células inflamatórias na parede de vias aéreas (Prado et al., 2008). O óxido nítrico derivado desta isoforma atua como neuromodulador e/ou neuromediador tanto em nível central como periférico, agindo na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação, via nervos periféricos. No pulmão, a isoforma nNOS é responsável pela broncodilatação na musculatura lisa das vias aéreas, pois atua nas terminações nervosas dos nervos do sistema não-adrenérgico não-colinérgico, particularmente como mediador do sistema i-NANC (Bult et al., 1990; Li e Rand, 1991; Belvisi et al., 1991; Imasaki et al., 2001, Prado et al., 2010).

A isoforma induzida, por outro lado, está presente em situações patológicas e sua estimulação produz grandes quantidades de óxido nítrico. A presença desta 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 múltiplas funções na resposta inflamatória (Meng et al., 2000; Birrell et al., 2003; Offer et al., 2003). Contrariamente às isoformas constitutivas, a iNOS não depende de cálcio para sua ativação, mas a síntese de mRNA da iNOS é necessária para sua atividade, sendo esta mantida por mais de 24 horas (Adams et al., 1996).

Devido a sua ação broncodilatadora, o aumento da produção de NO na asma por meio das isoformas constitutivas apresenta uma ação primariamente benéfica (agente protetor) (Hogman et al.,1993), enquanto a isoforma induzida apresenta uma ação tóxica, a qual exacerba, perpetua e amplifica a inflamação (Xiong et al., 1999; Ricciardolo et al., 2004). A citotoxidade do NO resulta, então, da sua ação direta, da sua concentração local, da enzima pela qual foi produzida e/ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (Schuiling et al., 1998).

1.4.1 INIBIDORES DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES

Embora a participação do NO na modulação da resposta inflamatória tenha sido intensamente investigada nos últimos dez anos, resultados bastante controversos ainda são encontrados na literatura, sugerindo que o NO tenha uma dupla função na patogênese da asma. Para permitir estudos mais aprofundados sobre a real participação de cada isoforma da NOS em diferentes aspectos fisiopatológicos, uma gama de inibidores da produção de NO tem sido desenvolvida, sendo cada vez mais aprimorados em sua seletividade e especificidade.

A produção de óxido nítrico pode ser inibida pelo bloqueio da enzima óxido nítrico sintase (Moncada, Higgs, 1993) ou ainda pela administração de falso substrato. Existe uma série de inibidores de óxido nítrico que são utilizados em laboratórios para bloquear a ação destas enzimas, como por exemplo**,** a N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamidina (1400W), L-NG-monometil-arginina (L-NMMA), a L-NG-nitroarginina metil ester (L-NAME), NG-nitro-L-arginina (L-NOARG), NG-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), L-NG-nitroarginina-p-nitroanilida (L-NAPNA), L-canavanina, hidroxicobalamina e aminoguanidina (Rees DD et al., 1990).

Embora, durante muitos anos a aminoguanidina tenha sido considerada um inibidor específico de iNOS recentemente tem sido questionada a sua especificidade no bloqueio desta isoforma (Birrell et al., 2003). Há alguns anos, Garvey et al. (1997) demonstraram que o 1400W apresenta alta seletividade na

inibição de iNOS tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentando efeitos tóxicos somente em altíssimas doses (25 mg/Kg). Desta forma, o 1400W passou a ser a ferramenta mais utilizada nos dois últimos anos para o estudo da participação do óxido nítrico produzido via iNOS em diversos processos fisiopatológicos, inclusive na asma brônquica.

Como a L-arginina é o substrato comum tanto para NOS quanto para as arginases, o bloqueio de uma destas vias enzimáticas pode modular indiretamente a atividade da outra (Meurs et al., 2002; Ricciardolo et al., 2004). A inibição crônica e inespecífica da produção de NO, por meio do L-NAME, resulta em intensa broncoconstrição basal após estímulo antigênico, particularmente em vias aéreas proximais, além de reduzir o número de células mononucleares e a formação de edema peribrônquico, aumentando a deposição de fibras colágenas na parede das vias aéreas distais (Prado et al., 2005, Prado et al., 2010).

Por outro lado, a inibição específica e seletiva de iNOS, por meio do 1400W, reduz a broncoconstrição, a inflamação e o processo de remodelamento brônquico em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias. Desta forma, estes resultados observados por nosso grupo de pesquisa, relacionados ao tratamento crônico com L-NAME neste modelo experimental (Prado et al., 2005b), podem ser atribuídos tanto à deficiência da produção de NO, quanto a estimulação da atividade da arginase devido a uma maior disponibilidade de substrato (Que LG et al., 1998; Boucher et al., 1999).

Naura et al (2010) testaram a hipótese de que a atuação da iNOS modula de formas diferentes a inflamação aguda das vias aéreas. Foi demonstrado que em camundongos sensibilizados e desafiados (protocolo agudo) com a iNOS suprimida geneticamente havia uma redução no número de eosinófilos, hipersecreção de muco e produção de IL5 e IL13. Essa proteção não ocorreu quando os animais foram expostos ao protocolo de exposição crônica ao antígeno. Cabe ressaltar que os animais recebiam ovoalbumina com hidróxido de alumínio via intraperitoneal duas vezes**,** durante uma semana**,** e eram desafiados com ovoalbumina 3% em aerossol por 30 minutos apenas uma vez, no protocolo agudo. Já no protocolo crônico, os animais recebiam o desafio uma ou duas vezes por semana por até 6 semanas.

A fibrose pulmonar não foi observada em animais com iNOS suprimida, apesar da produção persistente de IL5 e IL13, sugerindo que estas citocinas não são insuficientes para induzir a fibrose pulmonar. Esta proteção está associada a uma redução na síntese de colágeno e uma modulação indireta, porém importante de TGF beta (Naura et al., 2010).

1.5 O PAPEL DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO NA FISIOPATOGENIA DA ASMA

Embora a asma seja considerada uma doença de vias aéreas, a contribuição das alterações do tecido pulmonar periférico na resposta asmática total tem sido proposta (Tohda Y et al., 1998; Leick-Maldonado EA et al., 2004;

Wright RJ et al., 2005). Neste contexto, Kraft et al. (2007) observaram a presença de infiltração eosinofílica alveolar em pacientes com asma noturna. Além disso, os mesmos autores também sugeriram que a melhora da função pulmonar distal se correlacionava com a melhora dos sintomas da asma. Foi também demonstrado que há ligações alveolares anormais, com diminuição das fibras elásticas no tecido pulmonar periférico de pacientes que faleceram por asma fatal (Wright RJ et al., 2005). Em conjunto, estes dados sugerem que a resposta tecidual tem um importante papel na resposta contrátil de humanos asmáticos.

Tem sido demonstrada a contribuição da porção distal do pulmão para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (Yanai et al., 1992; Wagner et al., 1998). A esta região, antes conhecida como “zona silenciosa”, era atribuído somente 10% do valor total de resistência ao fluxo aéreo pulmonar. Do mesmo modo, novas metodologias possibilitaram demonstrar a existência de alterações estruturais e inflamatórias no tecido pulmonar periférico, similares às observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Minshal et al., 1998; De Magalhães, 2005; Lanças et al., 2006). Deve se levar em conta que o volume total e a área de superfície das vias aéreas distais são muito maiores do que o volume e a área de superfície de grandes vias aéreas. Tal fato gera uma implicação na patogênese da asma e na resposta ao seu tratamento, quando do desenvolvimento de qualquer alteração no pulmão distal em pacientes asmáticos (Tulic, Hamid, 2003).

Portanto, o pulmão periférico, considerado como as vias aéreas de calibre $\leq$ 2mm de diâmetro e o tecido pulmonar periférico adjacente, é como

fundamental na resistência pulmonar total (Bachofen,1968), alertando para a possibilidade da participação também do tecido pulmonar periférico na fisiopatologia da asma, o que provavelmente altera o conceito e principalmente as formas de pensar o tratamento da doença (Ludwig, Dallaire, 1994).

Deve se levar em consideração que muitos dos dispositivos utilizados para administração de esteróides inalatórios geram partículas que não chegam efetivamente às vias aéreas distais e ao tecido pulmonar periférico, sendo depostos principalmente em vias aéreas centrais (Kraft, 2007). Estes fatos chamam a atenção, pois podem ocorrer tratamentos insuficientes da doença. Portanto, um dos desafios terapêuticos da asma tem sido desenvolver novas tecnologias inalatórias que permitam uma melhor oferta destes agentes à porção distal do pulmão. As formulações mais novas de corticosteróides inalatórios, utilizando hidrofluorano (HFA), apresentam maior deposição distal, com taxa de deposição pulmonar que pode alcançar os 60%, enquanto 30% se depositam na orofaringe, podendo contribuir, a longo prazo, para a maior efetividade do tratamento destes pacientes (Ibiapina et al., 2004).

O local da resposta contrátil dos alvéolos pulmonares, ainda não está completamente estabelecido. Os mecanismos que podem estar potencialmente envolvidos nesta resposta são: resposta contrátil de miofibroblastos ou de outras células intersticiais, alterações na interface ar-líquido alveolar, alterações da matriz extracelular, contração de células musculares lisas ao nível de ductos alveolares, pequenas vias aéreas ou vasos presentes no tecido pulmonar periférico (Lai et al., 1994).

Embora classicamente saiba-se que o NO tem papel limitado em vias aéreas distais no tecido pulmonar periférico devido à redução dos nervos nitrérgicos (Dupuy et al., 1992) ao longo da árvore brônquica, demonstramos recentemente que o tratamento crônico com L-NAME interfere na resposta de resistência e elastância do tecido pulmonar periférico em cobaias com inflamação crônica de vias aéreas, sugerindo que o NO, e provavelmente a arginase II, estão envolvidos nas alterações do tecido pulmonar periférico presentes na asma (Angeli et al., 2008). Corroborando estes resultados, Numata et al. (1998) demonstraram que existe expressão de óxido nítrico constitutivo na região alveolar e tanto as isoformas constitutivas, quanto as induzidas foram detectadas em bronquíolos terminais.

Foi demonstrado que pacientes que morreram de asma apresentam importantes alterações no tecido pulmonar periférico. Mauad et al. (2004) estudaram 15 pacientes que foram a óbito por crises asmáticas e observaram a diminuição da quantidade de fibras elásticas em pequenas vias aéreas, que são essenciais para a manutenção do recolhimento elástico pulmonar sugerindo que tal fator poderia contribuir para o desfecho fatal observado nestes pacientes.

A avaliação das propriedades mecânicas e da resposta farmacológica da periferia do pulmão tem sido estudada em fragmentos de tecido pulmonar periférico (Dolhnikoff et al., 1999). Estudos realizados em cobaias e ratos, com fragmentos de tecido pulmonar periférico, apontam para uma característica de contração e relaxamento do tecido periférico, dependendo da droga utilizada, sugerindo a participação do tecido pulmonar periférico na resistência pulmonar

total. Romero et al. (2001) demonstraram que a broncoconstrição induz mudanças estruturais na matriz do tecido conectivo em fragmentos pulmonares.

Considerando o remodelamento pulmonar, foi verificado o aumento do conteúdo de colágeno e de actina na parede alveolar em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos. Tais alterações apresentaram correlação positiva com o aumento da resistência e elastância, evidenciando que a inflamação eosinofílica, as alterações mecânicas, assim como o remodelamento, não ocorrem apenas nas vias aéreas, mas também no tecido pulmonar periférico, levando a alterações mecânicas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. (Xisto et al., 2005)

Além disto, foi demonstrado que o tecido pulmonar periférico humano responde à estimulação contrátil por acetilcolina através do aumento da resistência e da elastância do tecido pulmonar periférico. Os autores notaram que não houve diferença na resposta contrátil entre os fragmentos pulmonares com e sem vias aéreas (detectadas por análise morfométrica). Além disto, as pequenas vias aéreas não são necessárias para que esta resposta ocorra. (Dolhnikoff et al., 1998). Este fato implica em resposta contrátil direta ao nível de parede alveolar e/ou de ducto alveolar.

Salerno et al. (1995) demonstraram que quanto mais proximais fossem os fragmentos, maior seria a influência da parede brônquica na determinação da resposta mecânica. Nakashima et al. (2008) mostraram que, em cobaias com inflamação alérgica crônica, a indução de tolerância oral atenuou as respostas de

mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico, bem como a resposta inflamatória eosinofílica. Angeli et al. (2008) estudaram os efeitos do tratamento crônico com L-NAME na mecânica pulmonar, nas respostas eosinofílica e de matriz extracelular induzidas por inflamação pulmonar crônica e verificaram que o NO contribui para a contração do tecido pulmonar periférico e para a deposição de fibras elásticas, neste modelo, sugerindo uma possível participação NO e, provavelmente da arginase na ativação do estresse oxidativo.

1.6 ASMA GRAVE

Desde meados da década de 90, com a ênfase colocada no tratamento antiinflamatório com corticosteróides inalados e posteriormente na sua associação com outras terapêuticas de controle, pode se observar a melhora dos resultados clínicos da maioria dos doentes com asma. Em paralelo, tem se tornado evidente que um pequeno grupo de doentes com asma, apesar de acompanhamento especializado e tratamento contínuo adequado, continua a ter sintomas persistentes, alterações da função pulmonar e exacerbações frequentes (Wenzel et al., 2003; Fonseca e Botelho, 2006).

Várias definições de asma grave têm sido propostas englobando habitualmente a utilização de altas doses de corticosteróides e diferentes níveis de sintomas, função pulmonar e exacerbações. A asma atinge proporção significativa de pessoas nos países desenvolvidos, no entanto a maioria tem uma

doença intermitente ou leve, com pouco impacto na sua vida cotidiana. (Fonseca e Botelho, 2006).

Apesar da ausência de estudos específicos, tem sido estimado que cerca de 10% dos doentes com asma têm sintomas e limitações importantes, exacerbações frequentes ou redução persistente da função respiratória. Estes doentes, apesar de intensamente tratados, são responsáveis pela maioria dos cuidados não programados por asma, internamentos e absenteísmo. (Moore e Peters, 2006). Assim se compreende que esta pequena percentagem de doentes seja responsável por grande parte dos custos associados à asma. De fato, os custos diretos relacionados com asma grave são cerca de oito vezes superiores aos da asma intermitente e mesmo duas vezes superiores aos da asma moderada (Godard et al., 2002; Fonseca, JA, 2003; Fonseca e Botelho, 2006).

Enquanto o conceito de asma grave está relacionado às características intrínsecas da doença, o conceito de asma de difícil controle engloba também fatores, que não sendo diretamente relacionados à asma, contribuem para os maus resultados obtidos. Assim, o conceito de asma de difícil controle preocupa-se mais diretamente com os cuidados de saúde, com a prática clínica “na vida real” e abrange situações clínicas como a existência de doenças concomitantes, a má aderência à terapêutica, a inacessibilidade a cuidados de saúde ou a contribuição de fatores psicológicos (Fonseca e Botelho, 2006).

A asma grave poderá ser entendida como um grupo de síndromes dentro da asma de difícil controle, estando a asma grave mais relacionada às alterações

fisiopatológicas dos doentes, cuja má resposta à terapêutica dependerá, fundamentalmente, das características da própria asma.

Um grupo de trabalho da Sociedade Torácica Americana**,** em 2002**,** (ATS), sugeriu uma definição específica e abrangente de asma grave, também designada refratária. Os pacientes com asma grave caracterizam um subgrupo que permanece sintomático (sintomas persistentes, crises frequentes e obstrução persistente das vias aéreas), apesar de medicação, em altas doses ou que necessita de medicação em doses elevadas para atingirem controle.

Segundo o GINA (2010), a asma persistente grave é definida pela presença de pelo menos um dos indicadores: sintomas diários, exacerbações frequentes, sintomas frequentes de asma noturna (várias vezes por semana), limitação nas atividades físicas, VEF_1 ou PFE ≤60% do previsto ou variabilidade do PFE ou VEF1> 30%. Estes indicadores foram definidos para os doentes sem tratamento.

A terapêutica farmacológica da asma persistente grave foi definida como corticoterapia inalada (>1000 µg/dia de beclometasona ou equivalente) e um beta-2 agonista de longa ação e, se necessário, um ou mais dos seguintes: teofilina de liberação prolongada, antagonista dos leucotrienos, agonista oral de longa ação, corticosteróide oral (Fonseca e Botelho, 2006).

O estudo ENFUMOSA (2003) transversal, multicêntrico**,** admite para definir asma grave pelo menos uma exacerbação de asma, no último ano,

apesar de tratamento com ≥1200µg/dia de budesonida ou beclometasona ou doses equivalentes de outros corticosteróides inalados ou orais.

Outro estudo, em 2004, TENOR, prospectivo, observacional e multicêntrico, empregou como critérios para definir asma grave e de difícil controle a grande utilização de Serviços de Saúde por parte dos doentes no último ano e medicações em altas doses (≥3 fármacos para controle da asma, corticosteróides inalados em altas doses, ≥1260 µg/dia de beclometasona ou equivalente; ≥5 mg/dia de prednisolona oral) para controle dos sintomas.

Entretanto, Alves et al. (2008) realizaram um estudo retrospectivo com 111 pacientes para estabelecer os fenótipos clínicos em portadores de asma grave, avaliando adesão ao tratamento e controle da doença por dados clínicos e funcionais. Ao final do estudo, foi constatado que um número significativo de portadores de ama grave não adere ao tratamento. Muitos pacientes com asma grave têm obstrução irreversível, mas o fenótipo clínico mais relevante é constituído pelos pacientes resistentes ao tratamento habitual.

1.7 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

1.7.1 ANTI-LEUCOTRIENOS

Em decorrência das evidências apresentadas anteriormente, foram desenvolvidas pesquisas para identificar substâncias que pudessem inibir a ação ou a síntese de leucotrienos. São duas as classes de agentes farmacológicos: os antagonistas competitivos de receptores de leucotrienos e os inibidores da síntese de leucotrienos. Montelucaste sódico, também conhecido como MK-0476 é um potente, competitivo e seletivo antagonista do receptor de leucotrieno D_4 (LTD_4).

Vidal et al. (2001) realizaram um estudo duplo cego e randomizado para comparar os efeitos do montelucaste e da budesonida, em pacientes com broncoconstrição induzida por exercício, com sinais clínicos há pelo menos 1 ano e com queda de, pelo menos 20% do VEF1 (volume expiratório forçado no 1º segundo) após exercício. Os pacientes receberam um dos tratamentos por 15 dias e, tanto o montelucaste quanto a budesonida reduziram significativamente a queda do VEF1, após exercício, comparativamente à condição basal (período de 15 dias sem nenhuma terapia). Entretanto, houve variações individuais consideráveis na resposta aos tratamentos. Os autores concluíram que, tanto a budesonida como o montelucaste são capazes de previnir a broncoconstrição induzida por exercício, mas que os fármacos devem ser testados em cada paciente antes de se optar por uma terapia de longa duração.

Crianças com asma podem responder melhor aos antagonistas dos receptores dos leucotrienos do que os corticosteróides inalados. Em 2010**,** Rabinovitch et al. determinaram se a relação entre a excreção urinária de 318 crianças com asma leve a moderada de leucotrieno E_4 (LTE_4) e a fração óxido nítrico exalado (FENO) destas crianças associa-se com a capacidade de resposta preferencial ao montelucaste em comparação com a terapia com propionato de fluticasona (FP). Os autores constataram que a razão entre leucotrienos e a fração de óxido nítrico exalado foi capaz de prever uma melhor resposta ao montelucaste do que a terapia com fluticasona nos pacientes com asma leve a moderada.

Estudos de eficácia terapêutica demonstram que os antileucotrienos são mais efetivos do que o tratamento com placebo. No entanto, comparativamente aos glicocorticóides inalatórios não há evidências suficientes em relação à superioridade desta forma de tratamento para a asma. Nota-se que há redução no número de exacerbações e no decréscimo da contagem de eosinófilos no sangue, em pacientes tratados com montelucaste sódico (Stelmach et al., 2002).

Em uma revisão sistemática, Joos et al. (2008) mostraram que o montelucaste, como terapia adicional ao corticosteróide inalatório, controla melhor pacientes com asma leve e moderada quando comparado com a monoterapia com corticosteróide inalatório. Embora a adição de salmeterol ao corticosteróide inalatório seja clinicamente tão efetiva quanto ou até mais efetiva do que a adição de montelucaste, este último pode ser mais seguro em uso prolongado e oferecer um tratamento alternativo para os estes pacientes.

A princípio, na ausência de conhecimento da resposta individual de um paciente ao tratamento com quaisquer das terapias, os dados favorecem iniciar o tratamento com um glicocorticóide inalatório (GINA, 2010). Entretanto, para pacientes com asma leve, há um número de circunstâncias que justificam a opção por antileucotrienos. Como exemplos, podemos citar pacientes com intolerância à aspirina, sintomas induzidos predominantemente por exercícios, dificuldades para a utilização dos dispositivos inalatórios ou eventualmente por terem apresentado efeitos adversos dos glicocorticóides inalatórios, tais quais disfonia e candidíase oral.

A asma induzida pelo exercício e a asma sensível à aspirina são caracterizadas por predomínio de resposta imediata e os leucotrienos cisteínicos são os principais mediadores desta resposta (Smith, 2001; GINA, 2010). Em crianças com asma leve estável, o treinamento físico diminuiu a responsividade brônquica à metacolina. O montelucaste também diminuiu a reatividade brônquica e reduziu as exacerbações, sugerindo uma ação sinérgica e benéfica destas duas intervenções na asma leve (Bonsignore et al., 2008; Jartti, 2008).

Vários estudos clínicos recentes, de tratamento prolongado, não demonstram maior efetividade dos anti-leucotrienos em comparação ao uso de glicocorticóides (Joos et al., 2008).

1.7.2 GLICOCORTICÓIDES

Os glicocorticóides por via sistêmica podem ser prescritos para o tratamento da asma persistente grave ou para exacerbações moderadas e graves da doença (McFadden, 1993). Contudo, sua administração sob a forma inalatória melhorou muito a segurança do tratamento (Cengizlier et al., 2000; Manning et al., 2008). Os glicocorticóides são fundamentais na modificação de diversos aspectos do complexo conjunto de respostas inflamatórias na asma. Atualmente são considerados como a principal terapia para controle da asma persistente leve, moderada e grave (GINA, 2010; IV Consenso Brasileiro para o Manejo da Asma - SBPT, 2006).

A asma leve e moderada pode ser bem controlada com baixas doses de esteróides inalado com ou sem broncodilatadores. No entanto, 5% a 10% dos pacientes apresentam mais exacerbações da doença apesar da medicação. Estudos recentes mostraram que o estresse oxidativo pode contribuir para o remodelamento, o que é associado a um componente de refratariedade da asma. No entanto, este mesmo estudo não demonstrou relatos de que o estresse oxidativo está envolvido na asma refratária, o que sugere que pacientes com asma refratária têm mais estresse oxidativo em suas vias aéreas comparados a pacientes com asma bem controlada (Sugiura et al., 2007).

A asma resistente aos glicocorticóides é um problema desafiador que pode ser associado com risco de vida à progressão da doença (GINA, 2010). A base molecular da insensibilidade à resistência aos glicocorticóides é

desconhecida. Hamid et al. (1999) removeram fragmentos do RNA recém sintetizado do receptor de glicocorticóide (GCR), pré-mRNA, o qual gerou um segundo receptor de glicocorticóide (GCRbeta), que não se liga ao glicocorticóide, mas antagoniza a atividade do receptor clássico. Portanto, um aumento desses receptores de glicocorticóides beta poderia explicar resistência aos glicocorticóides.

Além disso, a expressão do receptor de glicocorticóide beta em pacientes asmáticos resistentes aos glicocorticóides foi particularmente alta nas células das vias aéreas T, que desempenham um papel importante na patogênese da asma. Nos pacientes com bronquite crônica, não houve diferença significativa em relação aos controles normais. Os autores concluíram que a resistência aos glicocorticóides está associada a um aumento da expressão do receptor de glicocorticóide beta nas células das vias aéreas T (Hamid et al. 1999).

1.7.3 ANTI INOS

Singh et al. (2007) utilizaram um potente inibidor da iNOS (GW274150) para avaliar a importância deste tratamento na asma. Foram estudados 28 pacientes, que receberam o inibidor da iNOS, montelucaste ou placebo durante 14 dias. O tratamento com montelucaste não reduziu o óxido nítrico exalado. A inibição seletiva da iNOS reduziu efetivamente o óxido nítrico exalado, porém

não afetou hiperreatividade das vias aéreas ou o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar.

1.8 MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA CRÔNICA

Deste modo, torna-se importante utilizar um modelo experimental de inflamação crônica pulmonar para melhor compreender os mecanismos envolvidos na fisiopatogenia da asma brônquica. Julgou-se que, modelos experimentais com múltiplas exposições a antígenos inalatórios, são provavelmente mais relevantes (Ishida et al., 1989; Kips et al., 1992; Tibério et al., 1997). Como modelo experimental para o presente estudo de inflamação de vias aéreas optou-se então pelo previamente desenvolvido em nosso laboratório.

Utilizando modelo experimental de inflamação crônica de vias aéreas em cobaias induzida por múltiplas exposições a concentrações de aerossóis de ovoalbumina (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2004) demonstramos que ocorre aumento da broncoconstrição, da formação de edema peribrônquico, do recrutamento de células inflamatórias e remodelamento de vias aéreas e do tecido pulmonar periférico e das concentrações de óxido nítrico no ar exalado. Além disso, demonstramos recentemente que neste modelo ocorre um aumento da expressão de nNOS e iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos em vias aéreas distais (Prado et al., 2005; 2008). Todas as alterações encontradas em vias aéreas foram também descritas no tecido pulmonar periférico (Angeli et

al., 2008; Starling et al., 2009). Assim, este modelo representa várias das características observadas nos pacientes asmáticos e, por isso, é uma ferramenta adequada para vários estudos de mediadores que estão envolvidos nesta patogenia, contribuindo para futuras investigações de novas estratégias de tratamento.

1.9 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Embora o tratamento considerado como mais efetivo na asma seja o uso de glicocorticosteróides, alguns trabalhos demonstram que este tratamento não reverte o remodelamento pulmonar presente na asma (Henderson et al., 2006). Provavelmente devido a este motivo ocorre uma redução progressiva da função pulmonar nos pacientes asmáticos ao longo dos anos (Murray CS, 2008). Assim, outros fármacos têm sido desenvolvidos, como os antagonistas de receptores de leucotrienos (montelucaste sódico), na tentativa de elucidar possíveis mecanismos envolvidos neste processo.

É importante ressaltar como já demonstramos anteriormente, que no momento em que será iniciado o tratamento no presente estudo, os animais já apresentam aumento na deposição de colágeno e fibras elásticas na parede das vias aéreas e no tecido pulmonar periférico. Deste modo, será possível avaliar a efetividade destes medicamentos no processo de remodelamento que ocorre na fisiopatologia da asma experimental em cobaias. Portanto, este estudo visa contribuir não só para o melhor entendimento da fisiopatologia da asma, assim como para a melhor utilização dos tratamentos já disponíveis comercialmente.

Consideramos também que o estudo de inibidores da iNOS nas alterações do tecido pulmonar periférico possa ser de capital importância, uma vez que a utilização destas drogas como futuras estratégias terapêuticas é proposta por diversos autores. Salienta-se, um futuro promissor para o tratamento de algumas doenças, dentre elas, a asma. Além disso, o estudo do papel da inibição da iNOS pode contribuir para a melhor compreensão dos efeitos da disfunção do complexo arginase-NOS na fisiopatologia da asma, particularmente no remodelamento pulmonar. Ainda não foram encontrados estudos que avaliassem os efeitos de inibidores de iNOS no tecido pulmonar periférico comparativamente a outros fármacos, no qual fossem analisados não somente seus efeitos no controle da resposta inflamatória e no remodelamento do tecido pulmonar periférico.

2. OBJETIVOS

Este estudo visa avaliar os efeitos causados no tecido pulmonar periférico de cobaias com inflamação crônica os seguintes tratamentos: inibidor do cisteinil leucotrieno D_4 (montelucaste), glicocorticóide (dexametasona) e das suas associações a um inibidor específico da iNOS (1400W). Serão avaliados seguintes parâmetros:

1. Resposta eosinofílica;

2. Expressão celular de citocinas Th1 (IFN gama) e Th2 (IL-4, IL-5);

3. Resposta de remodelamento da matriz extracelular (fibras colágenas, elástica, TIMP-1, TGF beta e MMP9);

4. Ativação da resposta de estresse oxidativo (iNOS, isoprostano PGF2 alfa);

5. Conteúdo de actina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo está aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq número 0798/08). Foram utilizadas 70 cobaias Hartley do sexo masculino, tendo ocorrido seis perdas de animais durante os experimentos. Os animais apresentavam peso médio de 250g ao início do protocolo e foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Investigação Médica 20 (LIM-20), desta Faculdade, recebendo alimento e água *ad libitum*, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído, conforme recomendado no "Guia de cuidados e uso de animais de laboratório", publicado pelo *National Institute of Health (NIH publication* 85-23, revisado em 1985).

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais receberam:

a) Inalações com soro fisiológico 0,9% estéril (grupo SAL, n=8);

b) Inalações com ovoalbumina (grupo OVA, n=8);

c) Inalações com ovoalbumina e tratamento com dexametasona (grupo OVAD, n=8);

d) Inalações com ovoalbumina e tratamento com montelucaste (grupo OVAM, n=8);

e) Inalações com ovoalbumina e tratamento com 1400W i.p. (grupo OVAW, n=8);

f) Inalações com ovoalbumina e tratamento com montelucaste sódico e 1400W i.p. (grupo OVAMW, n=8);

g) Inalações com ovoalbumina e tratamento com dexametasona e 1400W i.p. (grupo OVADW, n=8).

3.2 PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

As cobaias foram colocadas em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (Soniclear, São Paulo, Brasil). Foram submetidas à inalação com aerossol de ovoalbumina diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) por 15 minutos ou até o aparecimento de sinais de desconforto respiratório. O protocolo de inalação foi repetido duas vezes por semana durante um período de quatro semanas. Animais controle foram submetidos à exposição de aerossol de solução de soro fisiológico seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

3.2.1 Tratamento com corticosteróide:

Vinte e quatro horas após a quarta inalação com ovoalbumina foi iniciado o tratamento diário de um grupo de cobaias (grupo OVAD) com dexametasona (2mg/kg/dia i.p.), durante as duas semanas seguintes de inalação com ovoalbumina. Nos dias de inalação com ovoalbumina, as cobaias receberam o tratamento cinco horas antes da exposição ao antígeno (Seco et al., 1998, Leick-Maldonado et al*.,* 2004).

3.2.2 Tratamento com montelucaste sódico

Vinte e quatro horas após a quarta inalação com ovoalbumina um grupo de cobaias (grupo OVAM) recebeu diariamente o antagonista de receptor de leucotrienos montelucaste sódico (10mg/kg, ressuspendido em salina 0,9%, PO) (*Merck Sharp & Dohme*). Nos dias de inalação com ovoalbumina, as cobaias receberam montelucaste sódico, quatro horas antes da exposição ao antígeno.

3.2.3 Tratamento com 1400W (inibidor específico da enzima óxido nítrico sintase induzida – iNOS)

Trinta minutos antes da sétima inalação foi feito o tratamento com (N-3-aminometil-benzil acetamidina-1400W) nos animais do grupo OVAW. O tratamento foi administrado diariamente por quatro dias, na dose de 2mg/Kg/dia/animal por via intraperitoneal, como previamente descrito (Prado *et al.,* 2006).

3.3 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Após quatro semanas todos os animais foram anestesiados, traqueostomizados, ligados a um ventilador para pequenos animais, exsanguinados, os pulmões retirados na capacidade funcional residual, fixados em formaldeído a 10%, em quantidade suficiente para imersão total do pulmão por 24 horas. Após este período, foram então transferidos para uma solução de etanol 70%. Depois de terminada a fixação, o material foi submetido a processamento em rotina histológica habitual com parafina, para obtenção de cortes de 4µm de espessura. Foram realizadas as seguintes colorações:

3.3.1 Quantificação de Eosinófilos:

As fatias de tecido pulmonar de 5µm foram fixadas com LUNA para avaliação de eosinófilos (Luna, 1986; Watanabe et al., 2004). A porcentagem de eosinófilos no tecido pulmonar periférico foi obtida por estudo morfométrico, com o auxílio de um retículo de área conhecida (50 retas e 100 pontos), acoplado a um microscópio óptico (CH30, Olympus, Japão).

A quantificação do número de células positivas foi feita pela razão entre o número de pontos que incidiam nas células positivas em uma determinada área e o número de pontos total que coincidia com a área de septo alveolar, no aumento de 1000x. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4 \mu m^2$). A contagem foi realizada em 10 campos no tecido pulmonar periférico, por corte (animal), selecionados de forma randômica. Vários autores já demonstraram previamente que este método é adequado e reprodutível (Garcia et al., 1994; Warth et al., 1995, Tibério et al., 1997; Tibério et al., 2003; Leick-Maldonado et al., 2004).

3.3.2 Coloração de Picro-Sírius:

Esta coloração foi utilizada para a contagem das fibras colágenas no tecido pulmonar periférico. Os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram corados por uma hora no Picro-Sírius à temperatura ambiente e

posteriormente, lavados em água corrente por cinco minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por seis minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas.

3.3.3 Coloração de Resorcina-Fucsina:

Esta coloração foi utilizada para evidenciar as fibras elásticas propriamente ditas e as eulanínicas. Os cortes foram desparafinados e hidratados em álcool 95º. Posteriormente, foram corados pela Resorcina-Fucsina e lavados em água corrente por cinco minutos. Foram realizadas duas trocas de álcool 70º durante 10 minutos, sendo esta etapa a da diferenciação das fibras. Os cortes foram desidratados, diafanizados e montados.

A avaliação do conteúdo de fibras colágenas e elásticas no tecido pulmonar perférico foi feita utilizando-se um sistema de análise digital onde a medida de densidade óptica é o método empregado para detecção das fibras. Foi utilizado um *Software* específico (*Image Pro Plus v.4.1, 1998, Media Cybernetics, EUA*). As imagens foram geradas por um microscópio (*DMR- Tipo 020-525.024*, Alemanha) conectado a uma câmera (*JVC, TKC1380 Digital Colour Video Camera*, Japão) e transmitidas a um computador. Os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas em relação à área total do tecido pulmonar periférico. Esta técnica já foi previamente padronizada e tem sido utilizada em outros estudos (Prado et al., 2005 a,b; 2006).

3.3.4 Avaliação Imunohistoquímica

Foi realizada a avaliação imunohistoquímica para IL4, IL5, TGF, IFNɣ, MMP9, TIMP1, actina, iNOS e isoprostano PGF2 alfa. As lâminas foram previamente preparadas com 3-aminopropil-trietoxisilano Silano (*Sigma*), contendo os cortes histológicos dos pulmões que foram inicialmente desparafinados e hidratados e submetidos aos seguintes procedimentos:

Etapa 1 - Recuperação antigênica

Por intermédio de Proteinase K por 20 minutos (37°C) seguidos de descanso de 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS.

Etapa 2 - Bloqueio e Incubação com Anticorpo Primário

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H_2O_2) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com os anticorpos primários: anti-IL4 (sc-1260), anti-IL5 (sc-7887), anti-TGF (sc-1836), anti-MMP9 (sc-6840), anti-TIMP1 (sc-5538), anti-IFNɣ (sc-8308) [sc: *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Califórnia, EUA.], isoprostano PGF2 alfa (*Oxford Biomedical Research, Rochester Hills*, MI, EUA), iNOS (RB-9242-P, *Lab Vision Products Corporation, NeoMarkers, Thermo Fisher Scientific*, Fremont, CA, EUA.), anti-actina de músculo liso humano (clone 1A 4, *Dako*, A/S, Dinamarca) diluídos em BSA na proporção de 1:500 (IL4), 1:200 (IL5), 1:150 (IFNgama), 1:200 (TGF),

1:250 (MMP9), 1:250 (TIMP1), 1:500 (isoprostano PGF2 alfa), 1:250 (iNOS), os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, e as lâminas incubadas durante toda a noite.

Etapa 3 - Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo

As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABCKit Vectastain (*Vector Elite - PK-6105* (anti-cabra) / *PK-6101* (anti-coelho). Apenas para os anticorpos primários anti-IL2 e anti-IL4, após a incubação do anticorpo secundário, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10V 3%, metanol (1:1) (2 x 10 minutos) e posteriormente incubação com o complexo.

Etapa 4 - Revelação

Foi feita a lavagem das lâminas em PBS e revelação pelo cromógeno 3,3diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Co*, Saint Louis, Missouri, EUA).

Etapa 5 - Contra-Coloração e Montagem das Lâminas

As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina Entellan (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) para microscopia.

As avaliações das células positivas para IL4, IL5, TGF, IFNɣ, MMP9, TIMP1 e iNOS no tecido pulmonar periférico foram realizadas por estudo morfométrico, com o auxílio de um retículo de área conhecida (50 retas e 100 pontos), acoplado a um microscópio óptico (*CH30, Olympus*, Japão). A quantificação do número de células positivas foi feita conforme descrito no item "quantificação de eosinófilos". Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4 \mu m^2$). A contagem foi realizada em 10 campos no tecido pulmonar periférico, por corte (animal), selecionados de forma randômica, como descrito acima**,** para avaliação do número de eosinófilos.

A detecção do conteúdo de isoprostano PGF2 alfa e de actina foi obtida pela razão entre o número de pontos que incidiram nas áreas positivas e o número de pontos que coincidiram na área de septo alveolar em aumento de 1000x. Os resultados foram expressos em porcentagem. A contagem foi realizada em 10 campos no tecido pulmonar periférico, por corte (animal), selecionados de forma randômica.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por intermédio do programa *SigmaStat* (*Jandel Scientific*, San Rafael, CA, EUA). Os valores foram expressos em média ± erro padrão (SEM) e os foram feitos gráficos de barras. Os dados foram examinados utilizando-se a Análise de Variância para um Fator (*One Way*

Analysis of Variance). As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de *Holm-Sidak*. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$ (Zar, 1984).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE ESTRUTURAS

Os fragmentos de tecido pulmonar distal foram representados principalmente por septos alveolares [porcentagem (%) de septos alveolares nos sete grupos experimentais: SAL: 89,83 ± 0,82%; OVA: 90,47 ± 0,48%; OVAW: 89,54 ± 0,39%, OVAD: 89,84 ± 0,37%; OVADW: 91,20 ± 0,60%; OVAM: 92,54 ± 0,02%; OVAMW: 89,96 ± 1,18%)]. Não houve diferença significativa entre o conteúdo de septos alveolares, as vias aéreas e os vasos nos grupos experimentais.

4.2 DENSIDADE DE EOSINÓFILOS

A *Figura 1* representa os valores da média ± EP da densidade de eosinófilos no septo alveolar. Houve um aumento na densidade de eosinófilos no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 12,53±0,54/$10^4\mu m^2$, SAL 5,15±0,24/$10^4\mu m^2$, $p<0,05$). Houve decréscimo deste conteúdo nos grupos OVAW (7,61±0,35/$10^4\mu m^2$), OVAM (7,96±0,57/$10^4\mu m^2$), OVAD (9,01±0,44/$10^4\mu m^2$), OVADW (9,50±0,38/$10^4\mu m^2$) e OVAMW (9,32±0,46/$10^4\mu m^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$).

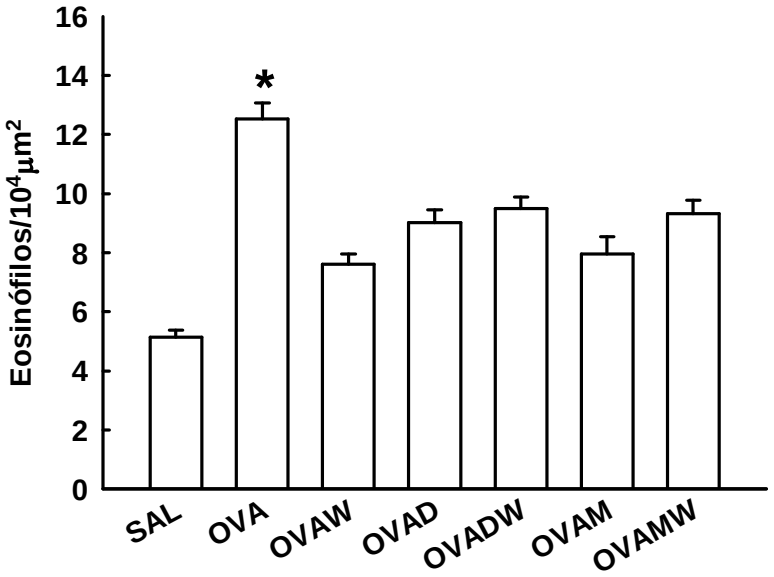

Figura 1. Valores de média ± EP da densidade de eosinófilos em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,05$ comparativamente aos demais grupos.

4.3 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA IL4 NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 2* mostra os valores de células positivas para IL4 por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para IL4 no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 9,12±0,43/10^4µm^2, SAL: 3,18±0,21/10^4µm^2, $p<0,05$). Houve redução do número de células positivas para IL4 nos grupos OVAW (4,94±0,45/10^4µm^2), OVAD (4,83±0,25/10^4µm^2), OVAM (8,86±0,41/10^4µm^2) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$). A associação do 1400W potencializou a redução do número de células positivas para IL4 nos grupos OVADW (2,80±0,20/10^4µm^2); OVAMW (5,09±0,18/10^4µm^2) comparativamente aos grupos OVAD e OVAM ($p<0,05$).

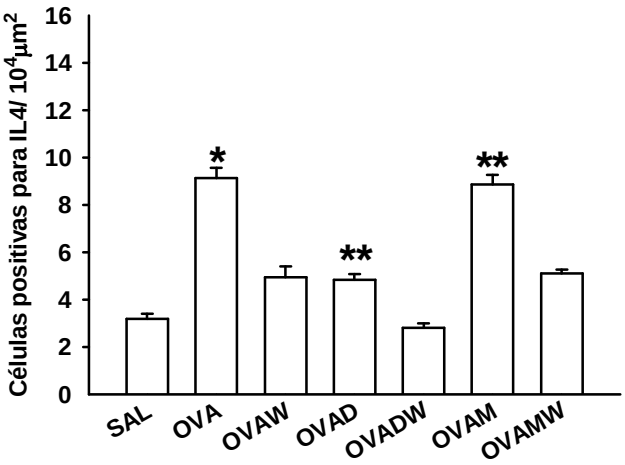

Figura 2. Valores de média ± EP de células positivas para IL4 em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,001$ comparativamente aos demais grupos; **$p<0,01$ comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.4 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA IL5 NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 3* mostra os valores de células positivas para IL5 por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para IL5 no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA 8,18±0,46/10^4µm^2, SAL 2,57±0,21/10^4µm^2, $p<0,05$). Houve redução do número de células positivas para IL5 nos grupos OVAW (4,90±0,45/10^4µm^2), OVAD (4,75±0,29/10^4µm^2); OVAM (6,23±0,34/10^4µm^2) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$). Cabe ressaltar que a associação do 1400W potencializou a redução do número de células positivas para IL5 no grupo OVADW (2,80±0,20/10^4µm^2) e OVAMW (5,01±0,26/10^4µm^2) comparativamente a grupo OVAD e OVAM, respectivamente ($p<0,05$).

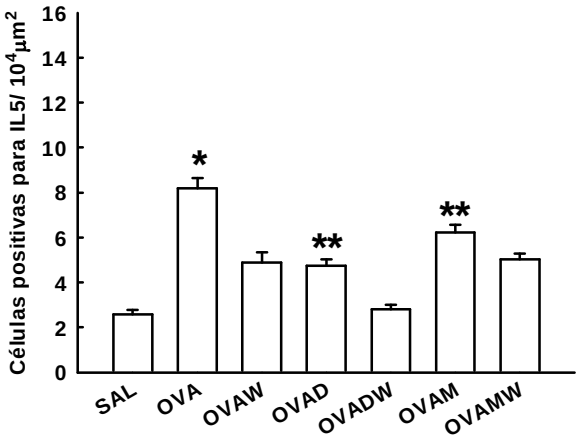

Figura 3. Valores de média ± EP de células positivas para IL5 em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,001$ comparativamente aos demais grupos; **$p<0,01$ comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.5 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA IFNγ NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 4* mostra os valores de células positivas para IFNγ por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para IFNγ no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 9,32±0,39/10^4μm^2, SAL: 3,03±0,18/10^4μm^2, $p<0,05$). Houve redução no número de células positivas para IFNγ nos grupos OVAW (4,60±0,36/10^4μm^2), OVAD (4,83±0,25/10^4μm^2) e OVAM (8,94±0,39/10^4μm^2) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$). A associação do 1400W potencializou a redução no número de células positivas para IFNγ nos grupos OVADW (2,97±0,20/10^4μm^2) e OVAMW (5,31±0,17/10^4μm^2) comparativamente aos grupos OVAD e OVAM, respectivamente ($p<0,05$).

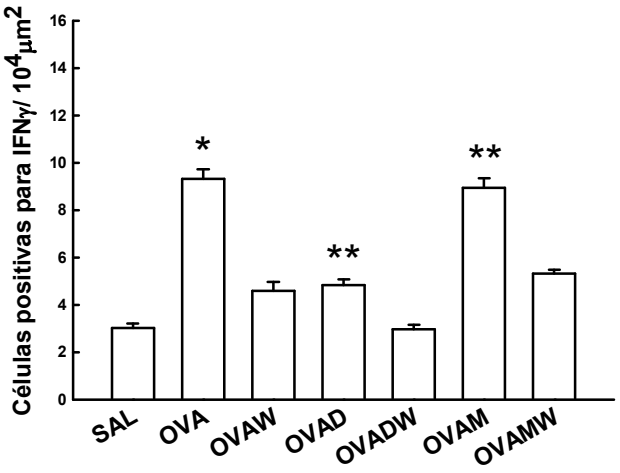

Figura 4. Valores de média ± EP de células positivas para IFNγ em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,001$ comparativamente aos demais grupos; **$p<0,05$ comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.6 Avaliação do Conteúdo de Fibras Colágenas e de Fibras Elásticas no Septo Alveolar

A *Figura 5* mostra o conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar. Houve um aumento no conteúdo de fibras colágenas no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 16,84±0,67%, SAL 8,65±0,43%, $p<0,05$). Houve redução no conteúdo destas fibras nos grupos OVAW (10,68±0,58%), OVAD (11,41±0,23%), OVADW (10,49±0,36%), OVAM (9,30±0,37%), OVAMW (10,68±0,38%), comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$).

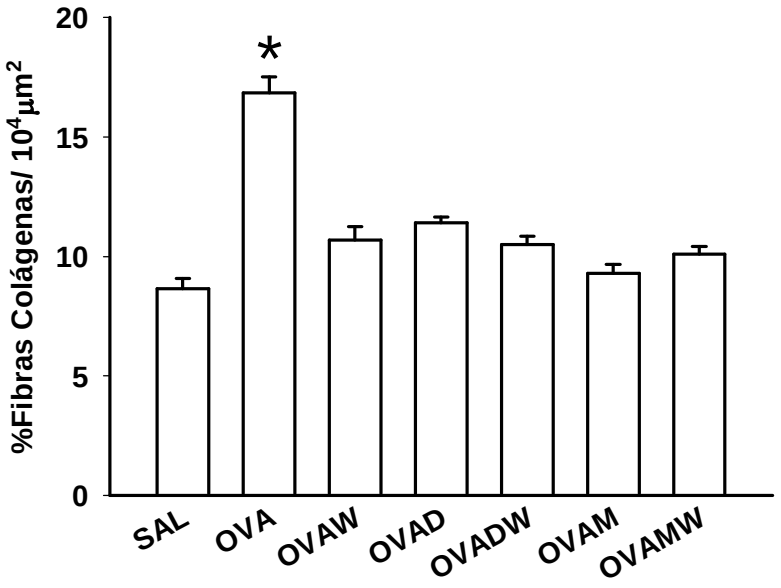

Figura 5. Valores de média ± EP da porcentagem de fibras colágenas em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,05$ comparativamente aos demais grupos.

A *Figura 6* mostra o conteúdo de fibras elásticas no septo alveolar. Houve um aumento no conteúdo das fibras elásticas no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA 12,65±0,65%, SAL 10,07±0,63%, p<0,05). Houve redução na porcentagem destas fibras nos grupos OVAM (10,91±0,70%) e OVAW (10,16±0,73%) comparativamente ao grupo OVA (p<0,05). A associação do 1400W potencializou a redução no conteúdo de fibras elásticas dos grupos OVAMW (4,31±0,21%), OVADW (6,81±0,25%) comparativamente aos grupos OVAM e OVAD, respectivamente (p<0,05). Cabe ressaltar que não houve efeito do tratamento com dexametasona (OVAD: 14,88±0,32%) isoladamente na deposição de fibras elásticas (p<0,05).

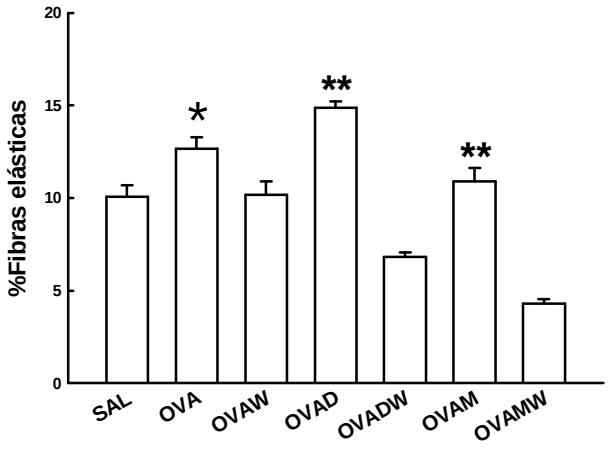

Figura 6. Valores de média ± EP da porcentagem de fibras elásticas em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *p<0,05 comparativamente aos demais grupos; **p<0,05 comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.7 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA TIMP1 NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 7* mostra os valores de células positivas para TIMP1 por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para TIMP1 no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos: OVA: 9,57±0,43/10^4µm^2, SAL: 3,18±0,21/10^4µm^2, $p<0,05$). Houve redução no número de células positivas para TIMP1 nos grupos OVAW (4,49±0,35/10^4µm^2), OVAD (4,56±0,26/10^4µm^2) e OVAM (7,62±0,35/10^4µm^2) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$). A associação do 1400W potencializou a redução no número de células positivas para TIMP1 nos grupos OVADW (2,87±0,18/10^4µm^2) e OVAMW (5,09±0,18/10^4µm^2) comparativamente aos grupos OVAD e OVAM, respectivamente ($p<0,05$).

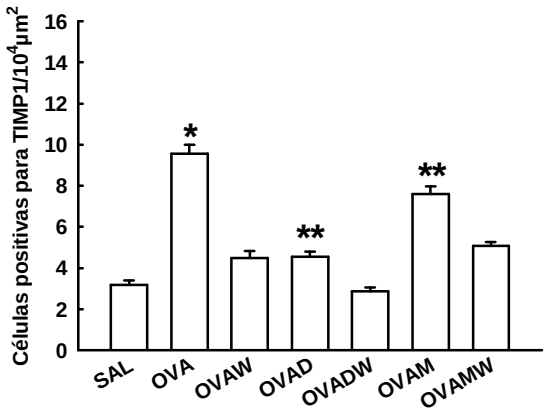

Figura 7. Valores de média ± EP de células positivas para TIMP1 em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,001$ comparativamente aos demais grupos; **$p<0,01$ comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.8 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MMP9 POSITIVAS PARA NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 8* mostra os valores de células positivas para MMP9 por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para MMP9 no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 9,63±0,47/10^4µm^2, SAL: 3,46±0,21/10^4µm^2, $p<0,05$). Houve redução no número de células positivas para MMP9 nos grupos OVAW (4,79±0,37/10^4µm^2), OVAD (5,41±0,33/10^4µm^2); OVADW (6,17±0,53/10^4µm^2); OVAM (6,39±0,39/10^4µm^2) e OVAMW (5,80±0,44/10^4µm^2) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$).

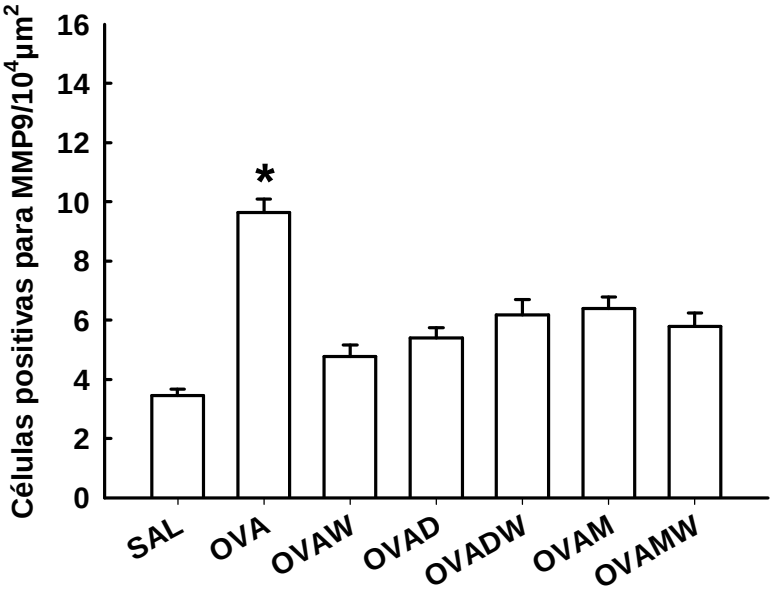

Figura 8. Valores de média ± EP de células positivas para MMP9 em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,001$ comparativamente aos demais grupos.

4.9 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA TGFβ NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 9* mostra os valores de células positivas para TGFβ por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para TGFβ no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 9,51±0,30/10^4μm^2, SAL: 2,72±0,16/10^4μm^2 , $p<0,05$). Houve redução no número de células positivas para TGFβ nos grupos OVAW (4,40±0,33/10^4μm^2), OVAD (4,74±0,25/10^4μm^2); OVADW (4,58±0,27/10^4μm^2) e OVAM (9,25±0,33/10^4μm^2) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$). A associação do 1400W potencializou a redução no número de células positivas para TGFβ no grupo OVAMW (6,81±0,35/10^4μm^2) comparativamente ao grupo OVAM ($p<0,05$).

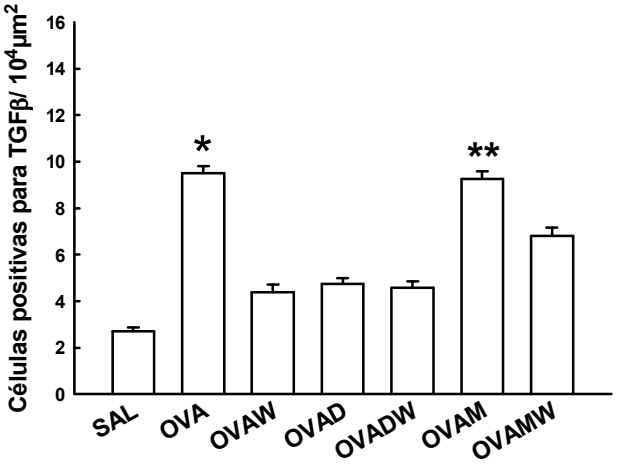

Figura 9. Valores de média ± EP de células positivas para TGFβ em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,001$ comparativamente a SAL, OVAW, OVAD,OVADW e OVAMW **$p<0,01$ comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVAMW).

4.10 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA iNOS NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 10* mostra os valores de células positivas para iNOS por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento no número de células positivas para iNOS no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 8,91±0,35/10^4µm^2, SAL: 3,27±0,20/10^4µm^2, p<0,05). Houve redução no número de células positivas para iNOS nos grupos OVAW (4,79±0,37/10^4µm^2), OVAD (5,41±0,33/10^4µm^2); OVADW (5,16±0,36/10^4µm^2); OVAM (8,71±0,35/10^4µm^2) comparativamente ao grupo OVA (p<0,05). A associação do 1400W potencializou a redução no número de células positivas para iNOS no grupo OVAMW (7,26±0,40/10^4µm^2) comparativamente ao grupo OVAM (p<0,05).

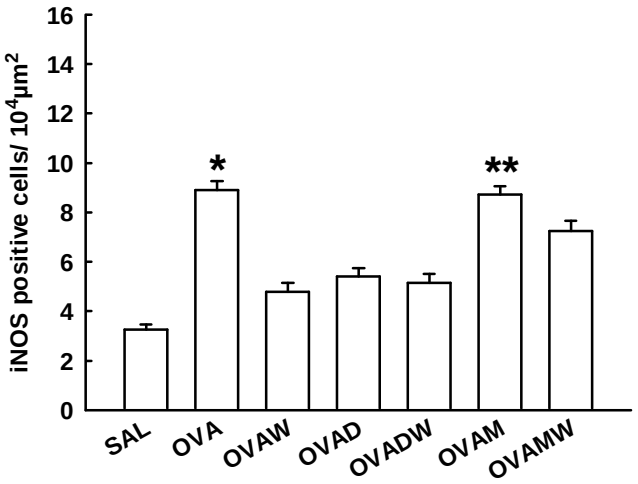

Figura 10. Valores de média ± EP de células positivas para iNOS em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *p<0,001 comparativamente aos demais grupos; **p<0,01 comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVAMW).

4.11 AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE VOLUME DE ACTINA NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 11* mostra a proporção de volume de actina por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento na proporção do volume de actina no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 9,63±0,47%, SAL: 3,46±0,21%, $p<0,05$). Houve redução na proporção do volume de actina nos grupos OVAW (5,68±0,24%); OVAD (6,28±0,22%) e OVAM (7,59±0,46%) comparativamente ao grupo OVA ($p<0,05$). A associação do 1400W potencializou a redução na proporção do volume de actina nos grupos OVADW (5,38±0,21%) e OVAMW (6,17±0,38%) comparativamente aos grupos OVAD e OVAM, respectivamente ($p<0,05$).

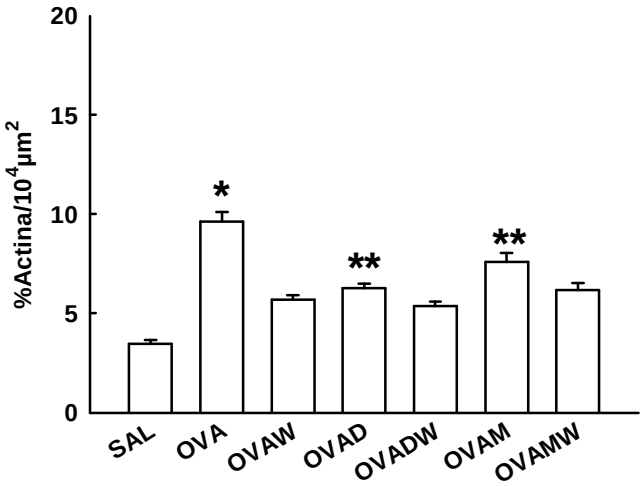

Figura 11. Valores de média ± EP da proporção do volume de actina em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *$p<0,05$ comparativamente aos demais grupos; **$p<0,05$ comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.12 AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE VOLUME DE ISOPROSTANO PGF2 ALFA NO SEPTO ALVEOLAR

A *Figura 12* mostra a proporção de volume de isoprostano PGF2 alfa por unidade de área de septo alveolar. Houve um aumento na proporção do volume de isoprostano PGF2 alfa no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: 14,46±0,24%, SAL: 3,22±0,21%, p<0,05). Houve redução na proporção do volume de isoprostano PGF2 alfa nos grupos OVAW (6,95±0,39%); OVAD (7,37±0,15%) e OVAM (9,57±0,42%). A associação do 1400W potencializou a redução na proporção do volume de isoprostano PGF2 alfa nos grupos OVADW (5,49±0,22%) e OVAMW (6,12±0,14%) comparativamente aos grupos OVAD e OVAM, respectivamente (p<0,05).

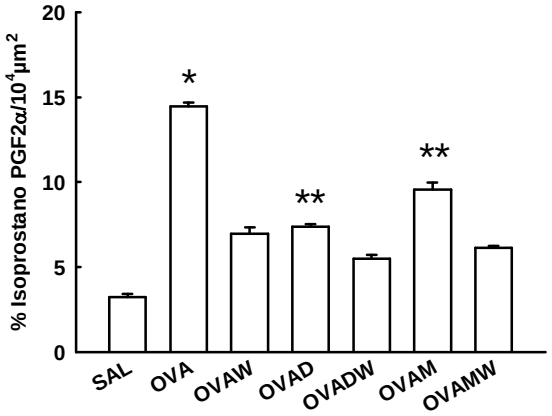

Figura 12. Valores de média ± EP da proporção do volume de isoprostano PGF2 alfa em tecido pulmonar periférico de cobaias repetidamente expostas à ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com 1400W (OVAW) ou dexametasona ou montelucaste sódico e suas associações (OVAD, OVADW, OVAM e OVAMW, respectivamente). *p<0,05 comparativamente aos demais grupos; **p<0,05 comparativamente ao grupo correspondente que também recebeu 1400W (OVADW e OVAMW).

4.13 ANÁLISE DESCRITIVA DOS FRAGMENTOS DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO

Na análise qualitativa do tecido periférico de animais expostos a ovoalbumina notamos que estes animais apresentaram um aumento no conteúdo de actina e isoprostano em relação aos demais grupos. Assim como uma intensa deposição de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar. Os tratamentos com 1400W, dexametasona e montelucaste sódico associados ou não ao 1400W reduziram o remodelamento da matriz extracelular caracterizado pela diminuição na deposição de fibras colágenas e elásticas (*Figura13*).

O tecido periférico de animais expostos à ovoalbumina apresentaram uma proeminente infiltração eosinofílica, associado a um aumento significativo das células positivas para iNOS, TGFβ e IFNɣ. Os tratamentos com 1400W, dexametasona e montelucaste sódico associados ou não 1400W reduziram esta resposta, caracterizados por uma atenuação no infiltrado eosinofílico e uma redução para as células positivas para iNOS, TGFβ e IFNɣ (*Figura 14*).

O tecido periférico de animais expostos à ovoalbumina apresentou um aumento significativo das células positivas para IL4, IL5, MMP9 e TIMP1. Os tratamentos com 1400W, dexametasona e montelucaste sódico associados ou não 1400W reduziram esta resposta, caracterizados por uma atenuação no infiltrado eosinofílico e uma redução para as células positivas para IL4, IL5, MMP9 e TIMP1 (*Figura 15*).

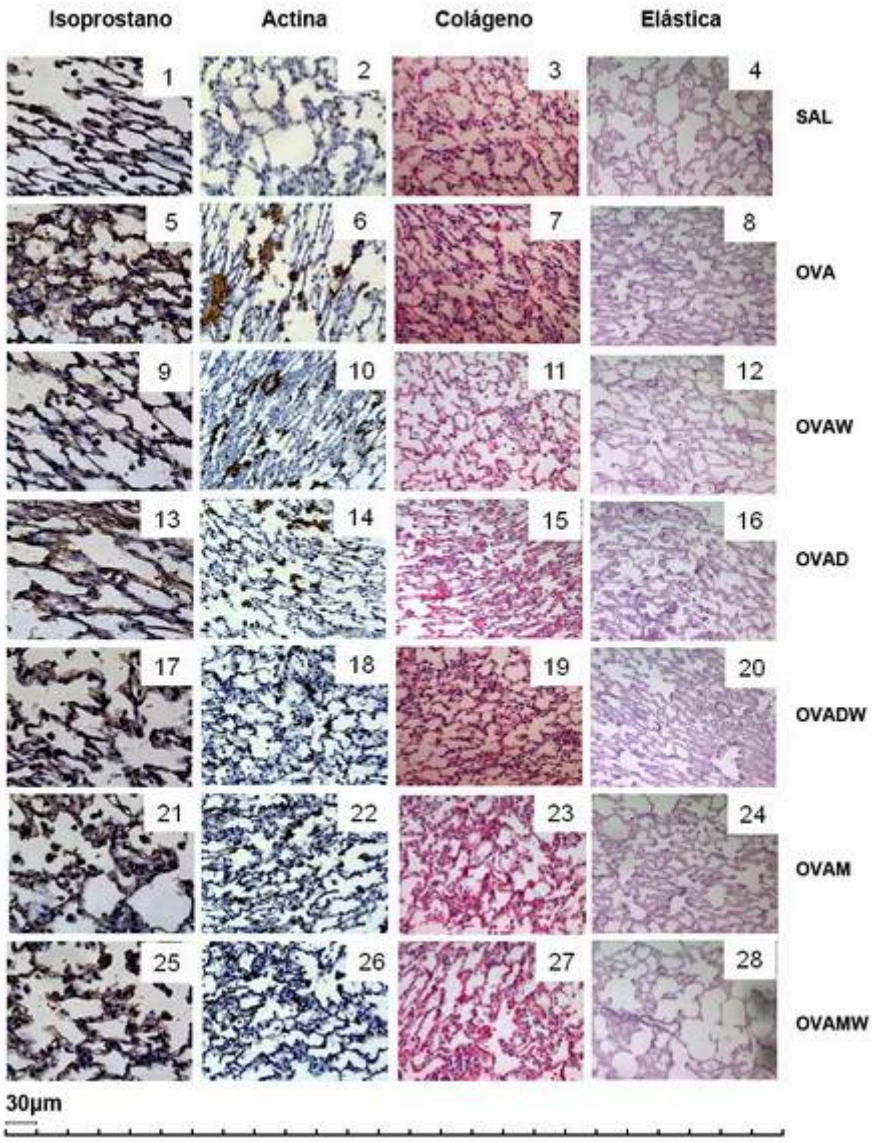

Figura 13. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar periférico, corados para detectar isoprostano PGF2 alfa (painéis 1, 5, 9, 13, 17, 21 e 25), corados para detectar actina (painéis 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26), fixados com Picro-Sírius para detectar colágeno (painéis 3, 7, 11, 15, 19, 23 e 27) Resorcina Fucsina de Weigert para detectar fibras elásticas (painéis 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28) de cobaias que receberam inalações com salina 0,9% SAL (painéis 1 a 4), de cobaias que receberam inalações com ovoalbumina [OVA(painéis 5 a 8)] ou aquelas que sofreram exposição crônica à ovoalbumina em associação com os seguintes tratamentos: 1400W [OVAW(painéis 9 a 12)], dexametasona [OVAD(painéis 13 a 16)] dexametasona + 1400W [OVADW(painéis 17 a 20)], montelucaste sódico [OVAM(painéis 21 a 24)] ou montelucaste sódico + 1400W [OVAMW(painéis 25 a 28)].

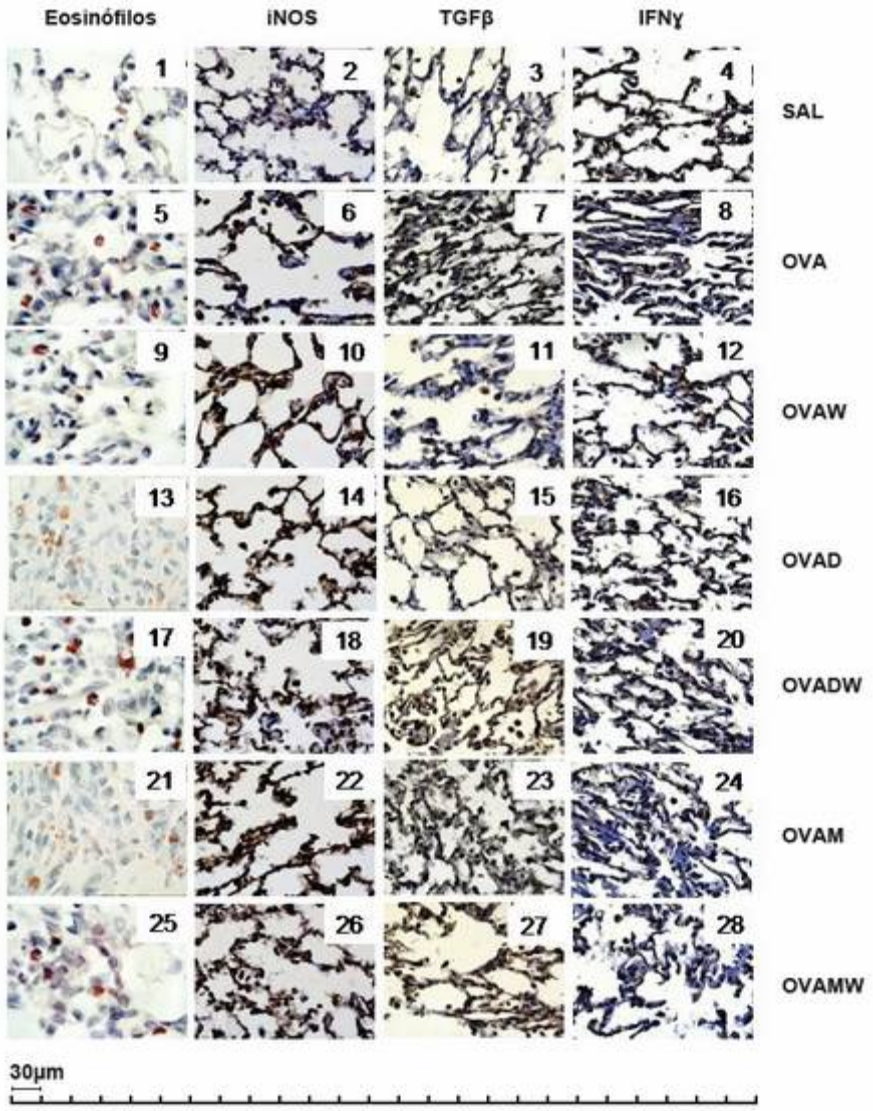

Figura 14. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar periférico, corados com LUNA para detectar eosinófilos (painéis 1, 5, 9, 13, 17, 21 E 25), corados para detectar células positivas para iNOS (painéis 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26), corados para detectar células positivas para TGFβ (painéis 3, 7, 11, 15, 19, 23 e 27), corados para detectar células positivas para IFNɣ (painéis 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28), de cobaias que receberam inalações com salina 0,9% SAL (painéis 1 a 4), de cobaias que receberam inalações com ovoalbumina [OVA(painéis 5 a 8)] ou aquelas que sofreram exposição crônica à ovoalbumina em associação com os seguintes tratamentos: 1400W [OVAW(painéis 9 a 12)], dexametasona [OVAD(painéis 13 a 16)] dexametasona + 1400W [OVADW(painéis 17 a 20)], montelucaste sódico [OVAM(painéis 21 a 24)] ou montelucaste sódico + 1400W [OVAMW(painéis 25 a 28)].

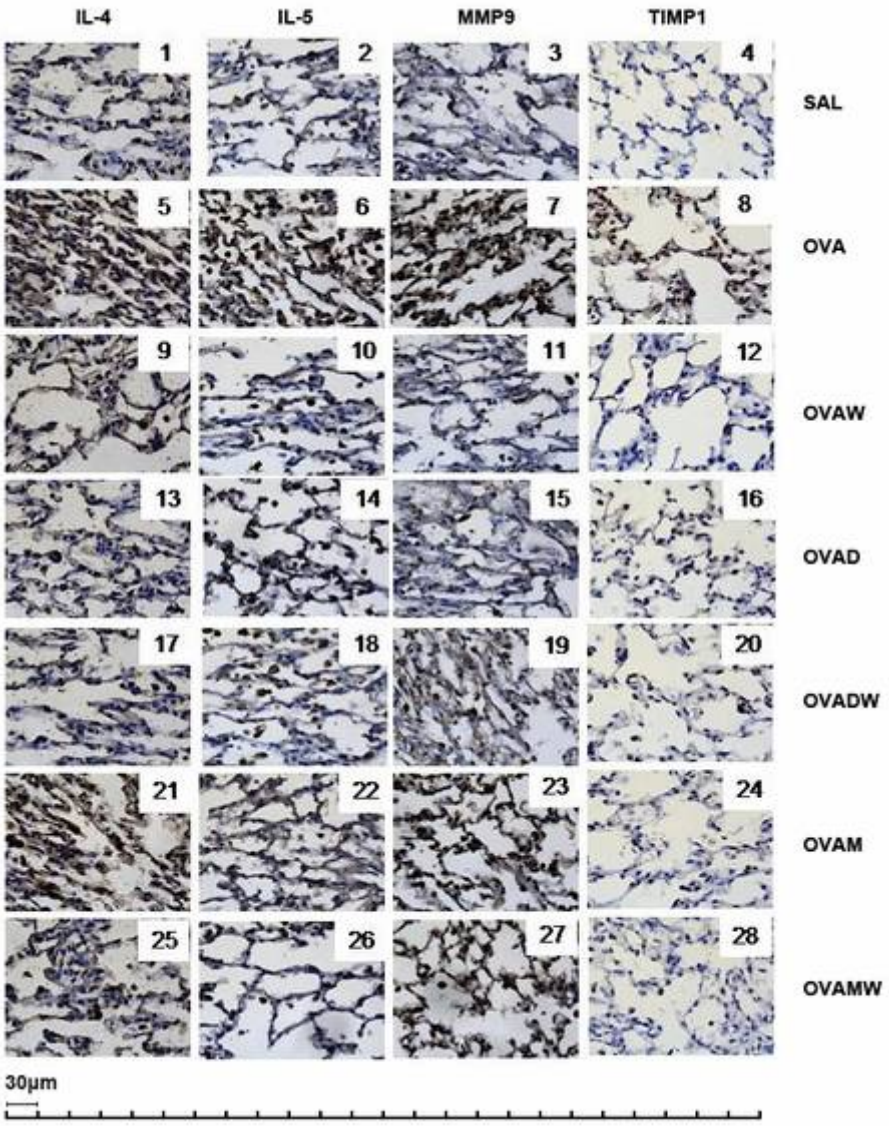

Figura 15. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar periférico, corados com LUNA para detectar eosinófilos (painéis 1, 5, 9, 13, 17, 21 E 25), corados para detectar células positivas para iNOS (painéis 2, 6, 10, 14, 18, 22 e 26), corados para detectar células positivas para TGFβ (painéis 3, 7, 11, 15, 19, 23 e 27), corados para detectar células positivas para IFNɣ (painéis 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28), de cobaias que receberam inalações com salina 0,9% SAL (painéis 1 a 4), de cobaias que receberam inalações com ovoalbumina [OVA(painéis 5 a 8)] ou aquelas que sofreram exposição crônica à ovoalbumina em associação com os seguintes tratamentos: 1400W [OVAW(painéis 9 a 12)], dexametasona [OVAD(painéis 13 a 16)] dexametasona + 1400W [OVADW(painéis 17 a 20)], montelucaste sódico [OVAM(painéis 21 a 24)] ou montelucaste sódico + 1400W [OVAMW(painéis 25 a 28)].

5. DISCUSSÃO

Embora nos últimos anos, um número considerável de estudos tenha enfatizado a importância de vários mediadores e moduladores inflamatórios na fisiopatologia das alterações presentes nas vias aéreas de asmáticos (Bousquet et al., 2000; Holgate, 2001, GINA, 2010), poucos estudos têm-se dedicado a avaliar os efeitos dos diversos tipos de opções terapêuticas e de novas drogas nas alterações do tecido pulmonar periférico, que também são de fundamental importância para o controle de pacientes asmáticos, particularmente aqueles com quadros graves e de difícil controle (Montuschi et al., 1999; Rocco et al., 2001, Fonseca et al., 2006; GINA, 2010, Naura et al., 2010).

No presente estudo demonstramos, no tecido pulmonar periférico de cobaias com inflamação alérgica crônica, que o tratamento isolado com corticosteróide foi eficiente em controlar a inflamação eosinofílica, a expressão celular citocinas de perfil Th2 (IL4 e IL5) e de perfil Th1 (IFN gama), assim como atenuação da resposta de estresse oxidativo e o conteúdo de actina. Houve controle da resposta de remodelamento da matriz extracelular em relação ao conteúdo de fibras colágenas, além da expressão celular de TIMP1, MMP9 e TGF beta. No entanto, não houve alteração da resposta de remodelamento das fibras elásticas.

Os tratamentos isolados com montelucaste ou anti-iNOS foram eficientes em controlar a inflamação eosinofílica, a expressão celular de citocinas de perfil Th1 e Th2, o remodelamento da matriz extracelular, a ativação de resposta de estresse oxidativo, além do conteúdo de actina.

Contudo, o tratamento isolado com montelucaste não foi efetivo no controle da expressão de TGF beta.

Embora já houvesse evidências em vias aéreas da importância destes tratamentos no controle das principais alterações morfofuncionais presentes na asma, o presente estudo esclarece que, em grande parte, o tratamento isolado com estas drogas foi capaz de controlar também as alterações do tecido pulmonar periférico. Cabe ressaltar que, no presente estudo, todas as drogas têm administração sistêmica e não inalatória, o que deve ter contribuído para a eficácia de tratamento no tecido pulmonar distal.

No entanto, nosso foco principal neste estudo foi esclarecer a importância da associação de uma nova classe de drogas que controla a produção de iNOS, como um instrumento terapêutico para o controle de alterações do tecido pulmonar periférico em um modelo com inflamação crônica tanto de vias aéreas como de tecido pulmonar periférico.

Neste sentido, observamos que o tratamento de glicocorticóide associado ao inibidor de iNOS em relação ao tratamento isolado com corticosteróide potencializou a redução da expressão celular de citocinas de perfil Th1 e Th2, além do conteúdo de actina. Em relação à ativação de resposta de estresse oxidativo houve potencialização apenas na expressão de isoprostano PGF2 alfa. Em relação ao remodelamento da matriz extracelular notamos potencialização da redução de fibras elásticas, que não haviam sido modificadas pelo tratamento isolado com glicocorticóide, e da expressão celular de TIMP1.

Em relação ao tratamento de montelucaste associado ao inibidor de iNOS comparativamente ao tratamento isolado com montelucaste, notamos potencialização da resposta de redução da expressão celular de citocinas de perfil Th1 e Th2, além do conteúdo de actina. Em relação à ativação de resposta de estresse oxidativo houve melhor controle da expressão celular de iNOS e de isoprostano PGF2 alfa. Quanto ao remodelamento da matriz extracelular observamos potencialização da redução de fibras elásticas e TGF beta, que não haviam sido modificadas pelo tratamento isolado com montelucaste, e da expressão celular de TIMP1.

Passaremos agora a discutir para cada um dos principais aspectos analisados, a saber: conteúdo de actina, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular, a importância desses tratamentos isolados e, principalmente, das associações terapêuticas.

CONTEÚDO DE ACTINA

Notamos que a associação de glicocorticóide quanto de montelucaste com anti-iNOS foram igualmente eficientes em potencializar o controle da expressão de actina. Cabe lembrar que a actina está presente fundamentalmente nos miofibroblastos e demais elementos contráteis do tecido pulmonar.

Cabe ressaltar que era nosso objetivo inicial avaliar a resposta contrátil do tecido pulmonar distal, associadamente à avaliação do conteúdo de actina. Contudo, por problemas técnicos não pudemos finalizá-la. No

entanto, em vários estudos anteriores neste modelo experimental, que avaliaram a resposta de mecânica oscilatório do tecido pulmonar distal, pudemos notar uma correlação entre a redução da resposta de hiper-responsividade pulmonar específica e inespecífica e o conteúdo de actina (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009).

Estudos *in vitro* demonstraram que a síntese de DNA e a proliferação das células musculares lisas das vias aéreas de humanos podem ser reduzidas pela administração exógena de doadores de óxido nítrico (Patel et al., 1999). Mais recentemente, demonstrou-se que o óxido nítrico inibe a proliferação das células da musculatura lisa das vias aéreas na fase G1 via GMPc dependente (Hamad e Knox, 2001).

Sendo assim, embora admitindo a limitação do presente estudo de não ter demonstrado novamente o controle desta resposta funcional no tecido pulmonar distal, consideramos que a potencialização da redução do conteúdo de actina é uma evidência a ser considerada como marcadora do controle da resposta funcional distal, reforçando a importância dessas associações como estratégia terapêutica quando há inflamação crônica pulmonar.

RESPOSTA INFLAMATÓRIA

No presente estudo observamos que tanto a associação de glicocorticóide quanto de montelucaste com anti-iNOS foi igualmente

eficiente em potencializar o controle da expressão de IL4, IL5 e IFN gama. Nenhuma das associações potencializou o controle da resposta eosinofílica, mantendo o controle já estabelecido pelo tratamento isolado com cada uma das drogas estudadas.

O papel determinante das diferentes citocinas e dos eosinófilos na modulação da resposta funcional pulmonar em asmáticos e em modelos experimentais de inflamação crônica tem sido objeto de vários estudos (GINA, 2010). Cabe lembrar que está bem estabelecido que na resposta alérgica ocorre predominância de células Th2. Após a ativação dos linfócitos pelo contato com o antígeno, a subpopulação CD4+ tem como principal função direcionar respostas imunes por intermédio da secreção de uma série de citocinas, entre elas IL4, IL13, IL5, IL9, IL6 e IL10, que são responsáveis pela estimulação da produção de IgE, contribuindo, assim, com a eosinofilia (GINA, 2010).

A IL4 parece estar envolvida na regulação da alta afinidade dos receptores para IgE presentes nos mastócitos e também na expressão de molécula vascular de adesão 1 (VCAM-1) no endotélio (Moser et al., 1992), contribuindo assim com o recrutamento de eosinófilos. Por este motivo, entre outros, alguns autores consideram a IL4 como mediador central da inflamação alérgica de vias aéreas.

Em modelo de inflamação de vias aéreas em camundongo a IL4 atua na regulação do recrutamento eosinofílico por um mecanismo linfócito T-dependente (Brusselle et al., 1994). Schleimer et al. (1992) demonstraram a

habilidade da IL4 em induzir o recrutamento seletivo dos granulócitos em reações alérgicas *in vivo*.

Vários estudos recentes sugerem que altas concentrações de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para GATA 3, um fator de transcrição restrito às células Th2, foram encontrados em biópsias brônquicas de pacientes asmáticos (Nakamura et al., 1999). Além disto, biópsias brônquicas e células do lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos apresentam aumento na expressão de RNAm para IL3, IL4, IL5 e GM-CSF (Busse, Lemanske, 2001).

Em relação aos eosinófilos, sabe-se que são encontrados em abundância em órgãos com interface epitelial como o trato gastrointestinal e trato respiratório (McFadden e Gilbert, 1992). A eosinofilopoiese é regulada por diversos mediadores, entre eles a IL3, IL5, e o GM-CSF. Quando maduro, o eosinófilo possui núcleo bilobulado e abundantes grânulos densos que além de servirem de estoque para mediadores inflamatórios, são fonte de proteínas inflamatórias, particularmente a proteína básica principal, a proteína catiônica eosinofílica e a proteína X do eosinófilo/neurotoxina derivada do eosinófilo.

A proteína básica principal possui característica única, podendo causar de forma direta o dano epitelial, intensificar a hiper-responsividade brônquica, e causar degranulação de basófilos e mastócitos. Entre as propriedades biológicas dos eosinófilos ainda se pode incluir a liberação de

radicais livres de oxigênio, eicosanóides e citocinas de classe Th2 (Ying et al., 1995). A IL5 induz a diferenciação terminal de eosinófilos imaturos (Sanderson, 1992). Além disso, estimula a liberação de eosinófilos na circulação e prolonga sua sobrevida. Sedgwick et al. (1991) demonstraram que a broncoprovocação com alérgeno aumenta a concentração local de IL5, sendo esta resposta positivamente correlacionada com o número de eosinófilos nas vias aéreas.

Em relação aos tratamentos isolados, vários autores já haviam demonstrado a eficácia destes tratamentos isolados e de outras estratégias terapêuticas, principalmente em vias aéreas de humanos e modelos experimentais. Nesse sentido, Blain, Sirois (2000) mostraram em camundongos sensibilizados e desafiados que há uma redução dose-dependente em eosinófilos recuperados no lavado broncoalveolar tanto pelo uso da dexametasona como pelo MK-571, um antagonista de receptor CisLT1.

Considerando o mesmo modelo experimental utilizado no presente estudo, Lanças et al. (2006) demonstraram que há um aumento na densidade eosinofílica alveolar em respostas precoces e tardias. Nakashima et al. (2008) demonstraram que a tolerância oral reduziu o recrutamento de eosinófilos no tecido pulmonar distal. Tibério et al. (2003) demonstraram que o bloqueio tanto substância P (SP) quanto neurocinina A (NKA) contribuem para o controle do recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas distais e na parede alveolar. Em concordância com esses estudos, Prado et al. (2006)

demonstraram que a inibição da iNOS por 1400W atenuou o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas.

Em outros modelos experimentais já foi demonstrado o efeito destes tratamentos. Henderson et al. (2002) mostraram que camundongos tratados com ovoalbumina e com inflamação crônica de vias aéreas desenvolveram um grande infiltrado eosinofílico e mononuclear no interstício pulmonar. Utilizando a técnica morfométrica, observaram uma redução de eosinófilos nos camundongos tratados com montelucaste sódico.

McMillan et al. (2005) demonstraram, em camundongos expostos cronicamente com ovoalbumina, que a administração crônica de budesonida foi capaz de reduzir a hiper-reatividade das vias aéreas, assim como a infiltração leucocitária, com decréscimo na produção de mediadores Th2, tais como IL4, IL12 e eotaxina-1. De Kluijver et al. (2005) expuseram pacientes com asma leve a repetidas exposições com baixas doses de alérgeno e concomitante uso de corticosteróide inalatório. Demonstraram que o uso destas medicações reduziu o número de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos T na mucosa.

Contudo, como pudemos observar, não há estudos que demonstrassem previamente que as associações de corticosteróides ou montelucaste ao inibidor de iNOS contribuem de forma significativa para a redução da resposta inflamatória do tecido pulmonar periférico com potencialização da redução de actina, o que claramente pode representar uma melhora nas perspectivas terapêuticas da inflamação crônica pulmonar.

ESTRESSE OXIDATIVO

Notamos no presente estudo que todos os tratamentos isoladamente tenham contribuído para a redução do número de células iNOS positivas e do conteúdo do isoprostano PGF2 alfa. Em relação às associações notamos que monteculaste e anti iNOS potencializou a redução dos dois parâmetros enquanto a associação de corticosteróide e anti iNOS apenas potencializou a redução do isoprostano PGF2 alfa. Uma provável explicação pode ser devida ao efeito conhecido do corticosteróide em reduzir a expressão de iNOS, o que isoladamente já contribuiu para o controle deste parâmetro.

As vias de ativação do estresse oxidativo têm um papel importante na regulação dos mediadores inflamatórios envolvidos com a atopia (Torres et al., 2004; Wright et al., 2005; Umetsu et al., 2006). O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes pende a favor das substâncias pró-oxidantes (Torres et al., 2004). Torres et al. (2004) demonstraram que ratos submetidos a estresse crônico variável apresentaram aumento na peroxidação lipídica pulmonar.

Fitzpatrick et al. (2009) demonstraram que crianças com asma grave apresentam aumento de vários marcadores de estresse oxidativo no fluido epitelial, sinalizando um aumento na resposta oxidativa. Em modelos experimentais, Jonasson et al. (2009) demonstraram em modelo de inflamação pulmonar aguda que os níveis de isoprostano PGF2 alfa no fluido do lavado broncoalveolar apresentavam-se aumentados assim como a reatividade brônquica.

A diminuição no número de células positivas para iNOS atenuou as respostas do estresse oxidativo, assim como reduziu o número de eosinófilos, o conteúdo de actina e de fibras elásticas, o que já foi demonstrado previamente em vias aéreas e em tecido pulmonar periférico (Prado et al., 2006, Almeida-Reis et al., 2010).

Neste modelo experimental já demonstramos anteriormente que as exposições repetidas à ovoalbumina potencializam a produção de NO (Prado et al., 2005, 2006, Angeli et al., 2008, Starling et al.,2009). O aumento de NO e sua interação com os radicais superóxido causa a formação de peroxinitritos. Este agente contribui para a peroxidação lipídica e geração de isoprostanos a partir do ácido araquidônico. Com estudos imunohistoquímicos é possível identificar PGF-2α, a principal substância da família dos isoprostanos produzida pela peroxidação de ácido araquidônico, como marcador da resposta de estresse oxidativo (Pryor, Squadrito, 1995; Muijers et al., 1997).

Os isoprostanos contribuem para a contração do músculo liso agindo por intermédio da tirosina quinase, Rho e Rho quinase levando a diminuição da atividade da fosfatase de cadeia leve da miosina, aumentando o nível de miosina fosforilada de cadeia leve e a contração (Morris, 2003).

Em relação aos mecanismos pelos quais o glicocorticóide sintético dexametasona suprime a expressão de iNOS, Walker et al. (1997) observaram que células RAW 264.7 estimuladas com estimulada por IFN gama e tratadas com dexametasona apresentam uma redução da formação de nitrito, um dos produtos finais estáveis da produção de NO medido em

cultura de sobrenadantes. A redução da atividade da iNOS foi causada pela diminuição dos níveis de proteína iNOS e a formação de mRNA da iNOS em cerca de 50%. Há também uma diminuição da transcrição do gene da iNOS e da estabilidade do mRNA da iNOS. Além disto, a dexametasona reduz a quantidade de proteína iNOS por dois mecanismos adicionais: redução da tradução de mRNA da iNOS e aumento da degradação da proteína da iNOS.

Embora vários estudos tenham demonstrado os efeitos do óxido nítrico (NO) nas vias aéreas proximais e distais (Dolhnikoff M et al., 1998; Meurs et al., 2000; Ricciardolo FL et al., 2003), o papel do NO na modulação das alterações do tecido pulmonar periférico, observadas nas respostas funcionais e histopatológicas de asmáticos, tem sido pouco estudadas.

Chakir J et al. (2003) demonstraram que a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi detectada em várias células inflamatórias incluindo macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos (Rocco PR, et al., 2001 Prado, CM et al., 2005; Prado, CM et al., 2006), fibroblastos pulmonares (Janssen LJ et al., 2001) e células epiteliais alveolares do tipo II (Weibel ER et al., 1963).

Embora outros autores tenham também mostrado que a produção de NO derivado da iNOS contribui para o recrutamento eosinofílico nas vias aéreas (Bousquet J et al., 2000; Meurs H et al., 2000; Boulet LP et al., 2000, Prado et al., 2006, Prado et al., 2010), outros estudos foram incapazes de detectar este efeito (Ritz T et al., 2000).

Vários autores têm demonstrado que o NO derivado das isoenzimas constitutivas agem no tônus do músculo liso e que o NO derivado principalmente da iNOS regula a resposta inflamatória (Bousquet J et al., 2000; Boulet LP et al., 2000). Demonstramos previamente, com o mesmo modelo animal usado neste estudo, um aumento no número de eosinófilos que expressam tanto a óxido nítrico sintase neuronal quanto a iNOS, ao redor das vias aéreas (Prado, CM et al., 2005, Prado et al.,2010).

No tecido pulmonar distal, Angeli et al. (2008) demonstraram que o tratamento com L-NAME, falso substrato para todas as óxido nítrico sintases, foi capaz de reduzir as respostas de estresse oxidativo, marcadas pela expressão do isoprostano PGF2 alfa, e reduzir o conteúdo de fibras elásticas, previamente aumentadas pelo estímulo inflamatório crônico. Estas alterações se associaram à atenuação da resposta contrátil do tecido pulmonar periférico. Starling et al. (2009) demonstraram que o tratamento com 1400W atenuou a resposta de mecânica pulmonar, a infiltração eosinofílica, a expressão de iNOS, de isoprostano PGF2 alfa e o conteúdo de fibras elásticas no tecido pulmonar periférico em cobaias com inflamação alérgica crônica.

Há algumas evidências em relação ao efeito do montelucaste nas respostas de estresse oxidativo. Offer et al. (2003) investigaram os efeitos do montelucaste (um antagonista dos receptores dos leucotrienos) na expressão da iNOS em ratos em modelo de inflamação alérgica e em células epiteliais do pulmão IL2. A inflamação alérgica foi induzida por ovalbumina

via intraperitoneal nos ratos seguido de tratamento com um montelucaste ou dexametasona.

Os níveis cisteinil leucotrienos foram medidos no lavado broncoalveolar e no pulmão, desta forma foi avaliada a expressão e atividade da iNOS. A expressão da iNOS foi significativamente maior nos ratos sensibilizados com ovoalbumina e desafiados em comparação com os controles, e os tratamentos com dexametasona e montelucaste. No entanto, diferenças não significativas na atividade da iNOS.

Não encontramos na literatura estudos que avaliassem estas associações no controle da resposta de estresse oxidativo. Além disto, como discutido previamente, na asma grave e de difícil controle a resposta de estresse oxidativo contribuiu para a manutenção das alterações estruturais. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que estas associações de tratamentos estudadas podem representar uma nova abordagem terapêutica com boas perspectivas de eficácia e, que claramente, também podem contribuir para o controle das alterações funcionais no tecido pulmonar distal.

REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR

Um novo paradigma se apresenta para a fisiopatogenia da asma, no qual a inflamação exagerada e o remodelamento pulmonar são consequência de lesões anormais e respostas de reparo, que levam à

susceptibilidade do epitélio brônquico aos componentes ambientais inalatórios (Yuan et al., 2003; Goleva et al., 2007).

Observamos que todos os tratamentos isoladamente foram eficientes em reduzir o conteúdo de fibras colágenas, TIMP1, MMP9 e TGF beta. Contudo em relação às fibras elásticas, apenas o tratamento com dexametasona não atenuou esta resposta. Estes dados estão de acordo com o observado por Goleva et al. (2007) que avaliaram pacientes asmáticos resistentes ou não a corticosteróides e não observaram diferenças nos dois grupos quanto a quantidade de elastase em polimorfonucleares.

No presente estudo, o tratamento de corticosteróide associado ao inibidor de iNOS em relação ao tratamento isolado com glicocorticosteróide potencializou a redução de fibras elásticas e da expressão celular de TIMP1. Em relação ao tratamento de montelucaste associado ao inibidor de iNOS comparativamente ao tratamento isolado com montelucaste, notamos potencialização da redução de fibras elásticas e da expressão celular de TIMP1 e TGF beta. Todos os tratamentos isoladamente foram capazes de reduzir o conteúdo de fibras colágenas no tecido pulmonar distal, e não observamos potencialização de resposta com nenhuma das associações de tratamento testadas.

Há várias evidências que justificam os resultados obtidos, particularmente em relação aos tratamentos isolados. Em relação aos leucotrienos cisteínicos (CisLTs), sabe-se que têm um papel fundamental no

remodelamento de vias aéreas observado na asma persistente, o qual inclui aumento de células mucosas nas vias aéreas, muco, vasos sanguíneos, músculo liso, miofibroblastos e fibrose de vias aéreas (Klujiver et al., 2005).

Holgate et al. (2003), utilizando modelo experimental de asma em camundongos, demonstraram que os antagonistas de receptores CisLT1 inibem o processo de remodelamento de vias aéreas, incluindo o influxo de eosinófilos para os pulmões, a desgranulação eosinofílica, a liberação de citocinas Th2, a hiperplasia de glândulas mucosas, hipersecreção de muco, hiperplasia de células musculares lisas, deposição de colágeno e fibrose pulmonar.

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 JA e Graesser D; 2000).

As metaloproteinases têm inibidores teciduais denominados TIMPs, sendo que o TIMP1 liga-se de forma covalente a MMP9 e também está aumentado na asma. No pulmão a MMP9 pode ser produzida por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e células dendríticas, entre outras (Ohno et al., 1997; Kelly et al., 2000; Atikinson e Sênior, 2003; Ohbayashi e Shimokata, 2005).

A MMP9 pode ativar mecanismos de reparo inadequados como a ativação da produção de TGFβ1 (fator transformador do crescimento beta) aumentando a síntese de colágeno pelos fibroblastos (Lee et al., 2001).

Yuan et al., (2003) estudaram o efeito da dexametasona sob o remodelamento das vias aéreas de ratos *Wistar* e avaliaram o equilíbrio entre as metaloproteinases e o inibidor tecidual das metaloproteinases. A expressão de MMP2 e TIMP1 nos pulmões foi avaliada por reação cadeia de polimerase. Houve uma correlação positiva entre MMP2 e TIMP1 no grupo controle, mas não no grupo de asmáticos. Portanto, os autores concluíram que a dexametasona poderia impedir o remodelamento das vias aéreas por redução da expressão de MMP2 e TIMP1 e restaurando o equilíbrio entre MMP2 e TIMP1.

Miller et al. (2006) demonstraram que os corticosteróides inibem a expressão de TGFbeta 1 em eosinófilos e macrófagos. McMillan et al. (2005) demonstraram, em camundongos expostos cronicamente com ovoalbumina, que a administração crônica de budesonida foi capaz de reduzir na deposição de colágeno peribronquiolar e a produção de muco. Os autores concluíram que o uso da budesonida modula a progressão do remodelamento das vias aéreas pela regulação da inflamação e inibição da sinalização para TGF beta1, e não pela diminuição da produção de TGF beta em nível proteico.

De Kluijver et al. (2005) expuseram pacientes com asma leve a repetidas exposições com baixas doses de alérgeno e concomitante uso de corticosteróide inalatório. Demonstraram que o tratamento foi capaz de

aumentar a quantidade de proteoglicanos, biglicam e versicam. Esta última observação aponta para a necessidade de se monitorar alterações provocadas pelo uso de corticosteróides na estrutura de vias aéreas em pacientes com asma.

Como os eosinófilos podem liberar ainda fatores de crescimento (Weller PF, 1991), elastase (Lungarella G et al., 1992) e metaloproteinases (Ohno et al., 1997) além de estimular fibroblastos (Hall e Walport, 1993), acredita-se que possam contribuir para os processos de fibrose tecidual e remodelamento de vias aéreas (Walz et al., 1993). Estes dados corroboram nossos achados visto que tanto para o recrutamento eosinofílico quanto para a avaliação do conteúdo de colágeno, todos os tratamentos foram efetivos, sem potencialização de resposta com as associações.

Em relação ao óxido nítrico, Gabazza EC et al. (2000) demonstraram uma correlação positiva entre as concentrações de nitrito/nitrato no escarro induzido de pacientes com asma e o remodelamento brônquico, insinuando assim que o NO esteja envolvido no processo de remodelamento de vias aéreas. Além disto, o óxido nítrico derivado de isoformas constitutivas age protegendo as alterações da matriz extracelular em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica, enquanto iNOS derivados NO contribuem para o aumento de ambas as fibras colágenas e elásticas (Prado et al., 2006, Prado et al., 2010). Vale ressaltar que os efeitos do óxido nítrico que contrapõem o remodelamento também podem ser observados no tecido tecido pulmonar periférico (Starling et al., 2009).

Hogaboam et al. (2005) estudaram um modelo de granuloma pulmonar não fibrótico e demonstraram que o L-NAME induz um aumento nos receptores de quimiocinas CC, CCR2 e CCR3, mRNA, reduz MCP-1 e eotaxina em cultura de fibroblastos isolados de pulmão, aumentando o conteúdo de colágeno.

Alguns autores têm discutido que a arginase que também, tem como substrato a L-arginina, pode atuar em miofibroblastos aumentando a produção de colágeno, via produção de L-ornitina (Ricciardolo et al., 2003; Meurs et al., 2003). Como descrito anteriormente, a arginase e a enzima óxido nítrico sintase utilizam um substrato comum. Portanto**,** o tratamento crônico com L-NAME é uma forma indireta de inferirmos o papel das arginases nas alterações encontradas neste modelo, particularmente no remodelamento de vias aéreas.

Relatos anteriores sugerem que a arginase pode interferir com a diferenciação de miofibroblastos, aumentando a produção de colágeno. Meurs et al. (2003) também sugeriram que a deficiência induzida por alérgenos de cNOS derivado do NO aumenta a atividade da arginase.

Cosiderando que o remodelamento das vias aéreas não é totalmente controlado por nenhum tratamento atual, a via do óxido nítrico pode ter efeito potencial como terapêutica no controle do remodelamento pulmonar. Sendo assim, o tratamento de corticosteróides ou montelucaste, associado ao bloqueio da iNOS, pode contribuir para um melhor controle da resposta de remodelamento da matriz extracelular, principalmente em relação ao

conteúdo de fibras elásticas, assim como de seus moduladores (MMPs e TIMP1 e TGF beta), contribuindo para a melhora do recolhimento elástico do tecido pulmonar distal e com prováveis repercussões funcionais.

6. CONCLUSÕES

Neste modelo de inflamação alérgica crônica pulmonar em cobaias foi possível observar no tecido pulmonar periférico que:

1. O tratamento isolado com corticosteróide foi eficiente em controlar a inflamação eosinofílica e a expressão celular citocinas de perfil Th2 (IL4 e IL5) e de perfil Th1 (IFN gama). Houve atenuação da resposta de estresse oxidativo, com redução da expressão celular de iNOS e do conteúdo de isoprostano PGF2 alfa, além do conteúdo de actina. A análise da resposta de remodelamento da matriz extracelular mostrou uma atenuação do conteúdo de fibras colágenas, além da expressão celular de TIMP1, MMP9 e TGF beta. No entanto, não houve alteração da resposta de remodelamento das fibras elásticas.

2. Os tratamentos isolados com montelucaste ou anti-iNOS foram eficientes em controlar a inflamação eosinofílica, a expressão celular de citocinas de perfil Th1 e Th2, o remodelamento da matriz extracelular, a ativação de resposta de estresse oxidativo, além do conteúdo de actina. Cabe apenas ressaltar que o tratamento isolado com montelucaste não modificou o número de células positivas para TGF beta.

3. O tratamento de corticosteróide associado ao inibidor de iNOS em relação ao tratamento isolado com corticosteróide potencializou a redução da expressão celular de citocinas de perfil Th1 e Th2, além do conteúdo de actina. Em relação à ativação de resposta de estresse oxidativo houve potencialização apenas na expressão de isoprostano

PGF2 alfa. Em relação ao remodelamento da matriz extracelular notamos potencialização da redução de fibras elásticas e da expressão celular de TIMP1.

4. O tratamento de montelucaste associado ao inibidor de iNOS em relação ao tratamento isolado com montelucaste potencializou a redução da expressão celular de citocinas de perfil Th1 e Th2, além do conteúdo de actina. Em relação à ativação de resposta de estresse oxidativo houve potencialização da expressão celular de iNOS e de isoprostano PGF2 alfa. Em relação ao remodelamento da matriz extracelular notamos potencialização da redução de fibras elásticas e da expressão celular de TIMP1 e TGF beta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209(7):1297-302.

Almeida-Reis R, Toledo AC, Reis FG, Marques RH, Prado CM, Dolhnikoff M, Martins MA, Leick-Maldonado EA, Tibério IF. Repeated stress reduces mucociliary clearance in animals with chronic allergic airway inflammation.*Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Aug 31;173(1):79-85.

Alves RSA, Vianna FAF, Pereira CAC. Fenótipos clínicos de asma grave *J Bras Pneumol.* 2008;34(9):646-6533

Amorim AJ, Daneluzzi JC. Prevalence of asthma in schoolchildren. *J Pediatr*. 2001;77(3):197-202.

Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PR, Tibério IF. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(6):L1197-205.

Asano M, Inoue H, Ichinose M, Okada S, Takishima T. Possible mechanisms of airway hyperresponsiveness after late asthmatic response in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994;103(1):88-94.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):12-24. Review.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Bio*l. 2003 Jan;28(1):12-24. Review.

Bachofen H. Lung tissue resistance and pulmonary hysteresis. *J Appl Physiol* 1968;24:296-301.

Barnes NC, Piper PJ, Costello JF. Comparative effects of inhaled leukotriene C_4, leukotriene D_4, and histamine in normal human subjects. *Thorax.* 1984;39:500-4.

Belvisi MG, Stretton D, Barnes PJ. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol.* 1991 Jun 6;198(2-3):219-

Bergeron C, Hauber HP, Gotfried M, Newman K, Dhanda R, Servi RJ, Ludwig M, Hamid Q. Evidence of remodeling in peripheral airways of patients with mild to moderate asthma: Effect of hydrofluoroalkaneflunisolide. *J Allergy Clin Immunol* 116: 983–989, 2005.

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 Pharm Experim Therap.* 2003;304:1285-91.

Bisgaard H, Pedersen M. SRS-A leukotrienes decrease the activity of human respiratory cilia. *Clin Allergy.* 1987;17(2):95-103.

Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy.* 2001;56(66):7-11.

Bonsignore MR, La Grutta S, Cibella F, Scichilone N, Cuttitta G, Interrante A, Marchese M, Veca M, Virzi' M, Bonanno A, Profita M, Morici G. Effects of exercise training and montelukast in children with mild asthma. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40(3):405-12.

Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Jul;55(8-9):1015-28. Review.

Boulet LP, Turcotte H, Laviolette M, Naud F, Bernier MC, Martel S, Chakir J. Airway hyperresponsiveness, inflammation, and subepithelial collagen deposition in recently diagnosed versus long-standing mild asthma. Influence of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Oct;162(4 Pt 1):1308-13.

Bousquet J. Global initiative for asthma (GINA) and its objectives. *Clin Exp Allergy*. 2000 Jun;30 Suppl 1:2-5.

Bredt DS, Hwang MP, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990;347:768-70.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Nov;86(22):9030-3.

Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy*. 1994 Jan;24(1):73-80.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990 May 24;345(6273):346-7.

Burgess CA, McCandless BK, Cooper JA, Malik AB. Leukotriene B_4 increases pulmonary transvascular filtration by a neutrophil-independent mechanism.J Appl Physiol. 1990;68(3):1260-4.

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

Busse WW. Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998b;157:S210-13.

Cengizlier R, Demirpolat E, Tülek N, Cakmak F. Circulating ICAM-1 levels in bronchial asthma and the effect of inhaled corticosteroids. Ann Allergy *Asthma Immunol.* 2000;84(5):539-41.

Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet LP, Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Jun;111(6):1293-8.

Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001 Feb;1(1):85-93.

Christie PE, .Jonas M, Tsai CH, Chi EY, Henderson WR Jr. Increase in laminin expression in allergic airway remodelling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J*. 2004 Jul;24(1):107-15.

Culotta E, Koshland DE. NO news is good news. Science. 1992;258:1862-3.

de Klujiver j, Schrumpf JA, Evertse CE, Sont JK, Roughley PJ, Rabe KF, Hiemstra PS, Mauad T, Sterk PJ. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005;35(10):1361-9.

De Magalhães SS, dos Santos MA, da Silva OM, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, Martins AM, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:602-11.

Dolan CM, Fraher KE, Bleeker ER, Borish L, Chipps B, HaydenML, et al. TENOR Study Group: Design and baseline characteristics of The Epidemiology and Natural History of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 92: 32-39.

Dolhnikoff M, Mauad T, Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160(5 Pt 1):1750-7.

Dolhnikoff M, Morin J, Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Nov;158(5 Pt 1):1607-12.

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 Aug;90(2):421-8.

Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Sep;148(3):720-6.

Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: Unique products of arachidonic acid oxidation - a review. *Curr Med Chem.* 2003;10:1723-40.

Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, Kummer W. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. Neurosci Lett. 1993;149(2):157-60.

Fitzpatrick AM, Brown LA, Holguin F, Teague WG Levels of nitric oxide oxidation products are increased in the epithelial lining fluid of children with persistent asthma.*J Allergy Clin Immunol.* 2009 Nov;124(5):990-6.e1-9.

Fonseca JA, Botelho C Asma grave: Definição *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2006;29(2):70-76 Revisão

Fonseca JA. Custos da doença alérgica. *Rev. Port. Imunoalergol* 2003; 11: 268-283.

Fowler MG, Davenport MG, Garg R. School functioning of US children with asthma. *Pediatrics.* 1992;90(6):939-44.

Gabazza EC, Taguchi O, Tamaki S, Murashima S, Kobayashi H, Yasui H, Kobayashi T, Hataji O, Adachi Y. Role of nitric oxide in airway remodelling. *Clin Sci* (Lond). 2000 Mar;98(3):291-4.

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.

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJR, Knowel RG. 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem.* 1997;272(8):4959-63.

Global Initiative for Asthma. *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. 2010. Available from www.ginasthma.org. Date last updated, 2010. Publication No. 02-3659.

Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. *Eur Respir J*. 2002 Jan;19(1):61-7.

Goleva E, Hauk PJ, Boguniewicz J, Martin RJ, Leung DY. Airway remodeling and lack of bronchodilator response in steroid-resistant asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007 Nov;120(5):1065-72.

Hall FC, Walport MJ. Hypereosinophilic syndromes: association with vasculitis, fibrosis and autoimmunity. *Clin Exp Allergy*. 1993 Jul;23(7):542-7.

Hamad AM, Knox AJ. Mechanisms mediating the antiproliferative effects of nitric oxide in cultured human airway smooth muscle cells. FEBS Lett. 2001 Oct 5;506(2):91-6.

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.

Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsicopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, Chrousos GP, Szefler SJ, Leung DY. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1600-4.

Henderson Jr WR, Chiang GKS, Tien Y-T, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by $CysLT_1$ receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:718-28.

Henderson Jr WR, Tang L-I, Chu S-J, Tsao S-M, Chiang GKS, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:108-16.

Hogaboam CM, Carpenter KJ, Schuh JM, Proudfoot AA, Bridger G, Buckland KF. The therapeutic potential in targeting CCR5 and CXCR4 receptors in infectious and allergic pulmonary disease. *Pharmacol Ther*. 2005 Sep;107(3):314-28. Review.

Högman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. *Eur Respir J*. 1993 Feb;6(2):177-80.

Holgate ST, Lackie PM, Howarth PH, Roche WR, Puddicombe SM, Richter A, Wilson SJ, Holloway JW, Davies DE Invited lecture: activation of the epithelial mesenchymal trophic unit in the pathogenesis of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Jan-Mar;124(1-3):253-8.

Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, Henderson WR. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(1 Suppl):S18-34

Horwitz RJ, McGill KA, Busse WW. The role of leukotriene modifiers in the treatment of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5Pt1):1363-71.

Ibiapina CC, Cruz AA, Camargos PA. Hydrofluoroalkane as a propellant for pressurized metered-dose inhalers: history, pulmonary deposition, pharmacokinetics, efficacy and safety. *J Pediatr* (Rio J). 2004;80(6):441-6. Review.

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(5):465-74.

Ishida K, Kelly LJ, Thomson RJ, Beattie LL, Schellenberg RR. Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *J Appl Physiol.* 1989;67(3):1133-9.

IV Consenso Brasileiro para o Manejo da Asma [IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma – SBPT]. *J Bras Pneumol*. 2006;32(7):S447-74.

Izumo T, Kondo M, Nagai A. Cysteinil-leukotriene 1 receptor antagonist attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Life Sci. 2007;80:1882-6.

Jancar S. Imunidade natural e inflamação. *In:* Calich V, Vaz C. *Imunologia básica.* São Paulo, Revinter, 2001. p.11-30.

Janssen LJ, Wattie J, Lu-Chao H, Tazzeo T. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. *J Appl Physiol.* 2001 Sep;91(3):1142-51.

Jartti T. Inhaled corticosteroids or montelukast as the preferred primary long-term treatment for pediatric asthma? *Eur J Pediatr.* 2008;167(7):731-6. Review.

Jonasson S, Hedenstierna G, Hedenström H, Hjoberg J. Comparisons of effects of intravenous and inhaled methacholine on airway physiology in a murine asthma model. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009 Feb 28;165(2-3):229-36.

Jones TR, Labelle M, Belley M, Champion E, Charette L, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Gauthier JY, Lord A, Masson P, et al. Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D_4 receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73(2):191-201. Erratum in: *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73(6):747.

Joos S, Miksch A, Szecsenyi J, Wieseler B, Grouven U, Kaiser T, Schneider A. Montelukast as add-on therapy to inhaled corticosteroids in the treatment of mild to moderate asthma: a systematic review. *Thorax.* 2008;63(5):453-62. Review.

Kang, HK, Morrow, JD, Roberts, LJ, Newman, JH, Banerjee, M. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F2α in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol.* 1993;74:460-5.

Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi-PGF2alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:590-6.

Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3Pt1):1157-61.

Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9(1):28-33. Review.

Kips JC, Cuvelier CA, Pauwels RA. Effect of acute and chronic antigen inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145(6):1306-10.

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(13):5159-62.

Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:371-77.

Kraft M. Part III: Location of asthma inflammation and the distal airways: clinical implications. *Curr Med Res Opin.* 2007;23 (3):S21-7.

Kumar RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? *Pharmacol Ther.* 2001;91(2):93-104. Review.

Lai YL, Thacker A, Gairola CG. Sidestream cigarette smoke exposure and airway reactivity during early life. *J Appl Physiol*. 1994 Oct;77(4):1868-74.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkka V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet*. 1993 Apr 17;341(8851):989-90

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.

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 strips. *J Appl Physiol.* 2006;100(5):1610-6.

Lauzon AM, Bates HT. Estimation. Of time-varying respiratory mechanical parameters by recursive least squares. *J Appl Physiol.* 1991;71:1159-65.

Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274(35):24441-4.

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001;194(6):809-21.

Leick-Maldonado EA, Kai 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 guiena-pigs. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:145-52.

Leick EA, Reis FG, Honorio-Neves FA, Almeida-Reis R, Prado CM, Martins MA, Tibério IF. Effects of repeated stress on distal airway inflammation, remodeling and mechanics in an animal model of chronic airway inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(1):1-9.

Li CG, Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1991 Jan;102(1):91-4.

Liu MC, Dubé LM, Lancaster J. Acute and chronic effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in asthma: a 6-month randomized multicenter trial. Zileuton Study Group. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(5Pt1):859-71.

Ludwig MS, Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol.* 1994;77:2029-35.

Luna LG. AFIP manual of histologic staining methods. *New York: Mc Graw Hill.* 1986.

Lungarella G, Menegazzi R, Gardi C, Spessotto P, de Santi MM, Bertoncin P, Patriarca P, Calzoni P, Zabucchi G Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Jan;292(1):128-35.

Madri JA, Graesser D Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases. *Dev Immunol*. 2000;7(2-4):103-16. Review.

Manning P, Gibson PG, Lasserson TJ. Ciclesonide versus other inhaled steroids for chronic asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(2):CD007031.

Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M. Slow-reacting substances, leukotrienes C_4 and D_4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 1982;126(3):449-51.

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernard FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004;170(8):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.

McFadden ER Jr, Gilbert IA. Asthma. *N Engl J Med.* 1992 Dec 31;327(27):1928-37.

McFadden ER Jr. Dosages of corticosteroids in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(5):1306-10.

McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Therapeutic administration of Budesonide ameliorates allergen-induced airway remodelling. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(3):388-96

Meng Q-H, 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, Hamer MA, Pethe S, Vadon-Le Goff S, Boucher JL, Zaagsma J.Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *Br J Pharmacol*. 2000 Aug;130(8):1793-8.

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.

Micheletto C, Guerriero M, Tognella S, Dal Negro RW. Effects of HFA- and CFC-beclomethasone dipropionate on the bronchial response to methacholine (Mch) in mild asthma. *Respir Med.* 2005;99:850-55.

Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson Roberts L 2nd, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* 2007;433:113-26.

Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(23):15533-7.

Ministério da Saúde [Internet]. Secretaria Executiva. Datasus [acesso em set. 2010]. Informações de Saúde.Informações epidemiológicas e morbidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>

Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:386-90.

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-arginina: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:1709-15.

Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled

condensation in asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:216-20.

Moore WC, Peters SP. Severe asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 487-494.

Morrow, JD, Harris TM, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for the measurement of eicosanoids. Anal Biochem. 1990;184:1-10.

Moser R, Fehr J, Olgiati L, Bruijnzeel PL. Migration of primed human eosinophils across cytokine-activated endothelial cell monolayers. *Blood*. 1992 Jun 1;79(11):2937-45.

Murray CS. Can inhaled corticosteroids influence the natural history of asthma? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Feb;8(1):77-81. Review.

Nagase T, Fukuchi Y, Dallaire MJ, Martin JG, Ludwig MS. In vitro airway and tissue responses to antigen in sensitized rats. Am J Respir Crit Care Med. 1995;153:81-86.

Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, Hamid Q. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma.*J Allergy Clin Immunol*. 1999 Feb;103(2 Pt 1):215-22.

Nakashima AS, Prado CM, Lanças T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. *J Appl Physiol.* 2008;104(6):1778-85.

National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Update on Selected Topics--2002.National Asthma Education and Prevention Program. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110(5):S141-219. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(3):466.

National Institutes of Health / Health Research Extension Act of 1985, Public Law 99-158, November 20, 1985, "Animals in Research" U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm#USGovPrinciples

Naura AS, Zerfaoui M, Kim H, Abd Elmageed ZY, Rodriguez PC, Hans CP, Ju J, Errami Y, Park J, Ochoa AC, Boulares AH. Requirement for inducible nitric oxide synthase in chronic allergen exposure-induced pulmonary fibrosis but not inflammation. *J Immunol*. 2010 Sep 1;185(5):3076-85.

Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, Kaneko T, Okubo T. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol*. 1998 Mar 15;160(6):3031-7

Offer S, Shoseyov D, Bibi H, Eliraz A, Madar Z. A leukotriene receptor antagonist modulates iNOS in the lung and in a leukotriene-gree cell model. *Nitric Oxide.* 2003;9:10-7.

Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(2):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(3):212-9.

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 Oct;13(13):1810-6

Peters-Golden M, Bailie M, Marshall T, Wilke C, Phan SH, Toews GB, Moore BB. Protection from pulmonary fibrosis in leukotriene-deficient mice. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:229-35.

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. 2005;288(4):L741-8.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. 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.* 2005;289(4):L677-83.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Miyamoto L, Yano LM, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Capsaicin-sensitive nerves and neurokinins modulate non-neuronal nNOS expression in lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;160(1):37-44.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, 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;35(4):457-65.

Proceedings of the ATS Workshop on Refractory Asthma. Current understanding, recommendations and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:2341-2351

Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med*. 1995 Dec;19(6):935-41. Review.

Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol.* 1998 Jul;275(1 Pt 1):L96-102.

Rabinovitch N, Reisdorph N, Silveira L, Gelfand EW. Urinary leukotriene E levels identify children with tobacco smoke exposure at risk for asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Aug;128(2):323-7.

Rees DD, Cellek S, Palmer RM, Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. Biochem *Biophys Res Commun*. 1990 Dec 14;173(2):541-7.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990 Nov;101(3):746-52.

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:3375-8.

Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:240-52.

Ricciardolo FL, Nijkamp FP, Folkerts G. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets*. 2006;7(6):721-35.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65.

Ricciardolo FL. cNOS-iNOS paradigm and arginase in asthma. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(11):560-1; author reply 562-3.

Richards J, Hirst P, Pitcairn G, Mahashabde S, Abramowitz W, Nolting A, Newman SP. Deposition and pharmacokinetics of flunisolide delivered from pressurized inhalers containing non-CFC and CFC propellants. *J Aerosol Med. 2001;*14:197-208.

Robbins RA. Nitric Oxide. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff AR, Asthma. Philadelphia:, Lippincott-Raven Publishers. 1997. p.695-705.

Rocco PR, Negri EM, Kurtz PM, Vasconcellos FP, Silva GH, Capelozzi VL, Romero PV, Zin WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Sep 15;164(6):1067-71.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989 Mar 11;1(8637):520-4.

Roche WR, Montefort S, Baker J, Holgate ST. Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Dec;148(6 Pt 2):S79-82.

Romero PV, Zin WA and Lopez-Aguilar J. Frequency characteristics of lung tissue strip during passive stretch and induced pneumoconstriction. *J Appl Physiol*. 2001;91: 882-90.

Salerno JC, Frey C, McMillan K, Williams RF, Masters BS, Griffith OW. Characterization by electron paramagnetic resonance of the interactions of L-arginine and L-thiocitrulline with the heme cofactor region of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27423-8.

Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. Blood. 1992 Jun 15;79(12):3101-9. Review. No abstract available.

Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, McIntyre BW, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol*. 1992 Feb 15;148(4):1086-92.

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.

Seco AJ, Salgueiro ME, Manso G. Acute and chronic treatment with glucocorticosteroids, modifying the beta 2-adrenergic response of the guinea pig trachea. *Lung.* 1995;173(5):321-8.

Sedgwick JB, Calhoun WJ, Gleich GJ, Kita H, Abrams JS, Schwartz LB, Volovitz B, Ben-Yaakov M, Busse WW. Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Dec;144(6):1274-81.

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 Dec;47(12):1064-74.

Singh D, Richards D, Knowles RG, Schwartz S, Woodcock A, Langley S, O'Connor BJ. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Nov 15;176(10):988-93.

Smith LJ. Comparative efficacy of inhaled corticosteroids and antileukotriene drugs in asthma. *Biodrugs.* 2001;15(4):239-49.

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 Jun;31(6):808-16.

Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase

inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009 Feb 28;165(2-3):185-94. Epub 2008 Dec 11.

Stelmach I, Grzelewski T, Majak P, Jerzynska J, Stelmach W, Kuna P. Effect of different antiasthmatic treatments on exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(2):383-9.

Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with montelukast on bronchial hyperresponsiveness and serum eosinophilic cationic protein (ECP), soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R), IL-4, and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(2):257-63.

Sugiura H, Komaki Y, Koarai A, Ichinose M. Nitrative stress in refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Feb;121(2):355-60.

Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 2007;56(4):331-40. Review.

Talati M, Meyrick B, Peebles RS Jr, Davies SS, Dworski R, Mernaugh R, Mitchell D, Boothby M, Roberts LJ 2nd, Sheller JR. Oxidant stress modulates murine allergic airway responses. *Free Radic Biol Med*. 2006 Apr 1;40(7):1210-9. Epub 2005 Dec 9.

Talati M, Meyrick B, Peebles RS Jr, Davies SS, Dworski R, Mernaugh R, Mitchell D, Boothby M, Roberts LJ 2nd, Sheller JR. Oxidant stress modulates murine allergic airway responses. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(7):1210-9.

Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem.* 1989;264(33):19654-8.

The ENFUMOSA Study Group. The ENFUMOSA cross-sectional European Multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. *Eur Respir J*. 2003; 22:470-477.

Tibério IFLC, Leick-Maldonado EA, Miyahara L, Kasahara DI, Spilborghs GMGT, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinins on airway and alveolar eosinophil recruitment. *Exp Lung Res.* 2003;29:167-77.

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.

Tiddens H, Silverman M, Bush A. The role of inflammation in airway disease: remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 162(2 Pt 2):S7-10, 2000.

Tohda Y, Kubo H, Haraguchi R, Iwanaga T, Fukuoka M, Nakajima S. Roles of histamine receptor in a guinea pig asthma model. *Int J Immunopharmacol.* 1998 Oct;20(10):565-71.

Tohda Y, Nanbu Y, Tanaka A, Kubo H, Fukuoka M, Nakajima S. Role of substance P in increased airway hypersensitivity following induced stress in a guinea pig asthma model. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1998 Nov-Dec;8(6):340-5.

Tohda Y, Ohkawa K, Kubo H, Muraki M, Fukuoka M, Nakajima S. Role of GABA receptors in the bronchial response: studies in sensitized guinea-pigs. *Clin Exp Allergy.* 1998 Jun;28(6):772-7.

Tokuriki S, Ohshima Y, Yamada A, Ohta N, Tsukahara H, Mayumi M. Leukotriene D(4) enhances the function of endothelin-1-primed fibroblasts. *Clin Immunol*. 2007 125(1):88-94.

Torres RL, Torres IL, Gamaro GD, Fontella FU, Silveira PP, Moreira JS, Lacerda M, Amoretti JR, Rech D, Dalmaz C, Belló AA. Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Feb;37(2):185-92.

Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: Potential therapeutic target Roger S. Mitchell Lecture. *Chest*. 2003;123;348-55.

Umetsu DT, Dekruyff RH. Immune dysregulation in asthma. *Curr Opin Immunol.* 2006 Dec;18(6):727-32.

VanderMeer TJ, Menconi MJ, O'Sullivan BP, Larkin VA, Wang H, Sofia M, Fink MP. Acute lung injury in endotoxemic pigs: role of leukotriene B4. *J Appl Physiol.* 1995;78(3):1121-31.

Vidal C, Fernández-Ovide E, Piñeiro J, Nuñez R, González-Quintela A. Comparison of montelukast versus budesonide in the treatment of exercise-induced bronchoconstriction. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001;86(6):655-8.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007a;176(9):871-7.

Vieira RP, Duarte AC, Claudino RC, Perini A, Santos AB, Moriya HT, Arantes-Costa FM, Martins MA, Carvalho CR, Dolhnikoff M. Creatine supplementation exacerbates allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007b;37(6):660-7.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):417S-22S.

Vignola AM. Effects of inhaled corticosteroids, leukotriene receptor antagonists, or both, plus long-acting beta2-agonists on asthma pathophysiology: a review of the evidence. *Drugs*. 2003;63 Suppl 2:35-51.

Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. *J Neurosci.* 1995 May;15(5 Pt 2):4033-45.

Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, et al. Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:447-52.

Walker G, Pfeilschifter J, Kunz D. Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 1997 Jun 27;272(26):16679-87.

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.

Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N Sugata, Takai T and Nishizaki K. Roles of FcgammaRIIB in nasal eosinoplhilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2004;169:105-12.

Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 1991 Jan;138(1):141-8.

Weller PF. The immunobiology of eosinophils.*N Engl J Med*. 1991 Apr 18;324(16):1110-8. Review

Wenzel SE, Trudeau JB, Kaminsky DA, Cohn J, Martin RJ, Westcott JY. Effect of 5-Lipoxygenase inhibition on bronchoconstriction and airway inflammation in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152:897-905.

Wenzel SE. A different disease, many diseases or mild asthma gone bad? Challenges of severe asthma. *Eur Respir J.* 2003;22: 397-398.

Wong AG, Pavord ID, Sears MR, Hargreave FE. A case for serial examination of sputum inflammatory cells. *Eur Respir J.* 1996 Oct;9(10):2174-5.

Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids.* 2000 Sep;35(9):967-74.

Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J.* 2003;21(1):177-86.

World Health Organization. World Health Report 2000 making a difference. Geneve, WHO, 2000.

Wright RJ, Cohen RT, Cohen S. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;5(1):23-9. Review.

Wright RJ, Cohen RT, Cohen S. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;5(1):23-9. Review.

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.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan S, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol.* 1999;162:445-52.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. Am *J Respir Crit Care Med.* 2005;171:829-37.

Yanai M, Sekizawa K, Ohrui T et al. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol.* 1992;72:1016-23.

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 May;12(5):477-87.

Yuan Y, Wang Z, Dong B.Modulation of matrix metalloproteinase by dexamethasone in airway remodeling in asthmatic rats.*Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003 Oct;34(4):680-3. Chinese.

Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1984. p.206-35.