CLÁUDIA JEANE CLAUDINO DE PONTES MIRANDA

Efeito do tratamento com PNU-282987, agonista do receptor colinérgico nicotínico α7, na resposta inflamatória e de remodelamento brônquico em modelo experimental de asma

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios

e Alérgicos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carla Máximo Prado

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Miranda, Cláudia Jeane Claudino de Pontes

Efeito do tratamento com PNU-282987, agonista do receptor colinérgico nicotínico α 7, na resposta inflamatória e de remodelamento brônquico em modelo experimental de asma / Cláudia Jeane Claudino de Pontes Miranda. -- São Paulo, 2016.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Carla Máximo Prado.

Descritores: 1.Asma 2.Receptor nicotínico de acetilcolina alfa7 3.Modelos animais 4.Camundongos 5.PNU-282987 6.Receptores colinérgicos

USP/FM/DBD-372/16

Dedicatória

A Deus presença forte, constante e infinitavemente reparadora.

Aos meus pais, professores de profissão, que dedicaram a vida a minha formação moral e ética, além de me apresentar o conhecimento de uma forma lúdica de tal maneira que estudar não era obrigação, mas uma oportunidade de crescimento pessoal.

Ao meu marido, Rogério dos Anjos Miranda, homem de caráter exemplar e eixo de equilíbrio na nossa feliz dinâmica familiar.

Aos meus amados filhos lasmin e Rogério, a razão e o porquê de tudo, bálsamos dos meus dias de cansaço. A vocês meus filhos dedico todo meu afeto e amor

A Luciana Aristóteles, amiga de longa jornada, mulher admirável, independente e corajosa. Nossa vida vem caminhando junto e sempre uma equilibrando a outra. Como é bom ter alguém que nos conhece pelo olhar e sabe como ninguém dizer a palavra certa.

A Gabriela Yoshikawa e a Cláudia Martins, mães e amigas especiais que me permitiram o prazer de compartilhar nossas vidas com ouvidos atentos, falas pensadas e elaboradas para acalentar e acima de tudo atitudes de imensurável prática do valor da amizade.

A Claudiane e Lourdinha, parceiras fiéis a quem confio o meu lar e fico tranquila para seguir trabalhando. Obrigada pelo sorriso farto e pelo trabalho realizado com competência e amor.

A todos os professores que passaram na minha vida, desde a mais tenra infância, meu respeito e a minha profunda admiração pelo seu trabalho germinador do conhecimento.

Agradecimentos

A Carla Máximo Prado, pesquisadora dedicada e apaixonada por seu trabalho. Mulher de caracter marcante, inteligente e ética. Tenho pela Carla o mais profundo sentimento de graditão e respeito, sem suas mãos firmes este sonho não seria possível. Obrigada por simplesmente você ser assim integra, humana e transparente e principalmente pelos anos de convivência (mestrado e doutorado), envoltos com muito aprendizado e incentivo.

A Nathalia Montouro Pinheiro e Fernanda Paula Roncon Santana, companheiras de toda dinâmica das horas de experimentos. A jornada com vocês foi rica, produtiva e feliz. Hoje tenho o orgulho de tê-las como amigas. Obrigada pelas palavras de apoio e incentivo quando tudo parecia que ia dar errado.

A Dra. Adenir, pelas habilidosas mãos e rigor durante os experimentos.

Ao Professor Milton de Arruda Martins por toda a colaboração para realização desse projeto e pela dedicação e competência com que administra o Laboratório de Terapêutica Experimental I.

A todos aqueles que de alguma forma contribuiram para minha formação e para esta Tese, particularmente a todos do Laboratório de Estudos em Inflamação Pulmonar, Lab 22, UNIFESP Diadema, e Laboratório de Terapêutica Experimental I – LIM 20 – FMUSP.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a realização deste projeto.

Não é o trabalho, mas o saber trabalhar, que é o segredo do êxito no trabalho. Saber trabalhar quer dizer:

Não fazer um esforço inútil, persistir no esforço até o fim, e saber reconstruir uma orientação, quando se verificou que ela era, ou se tornou, errada.

(Fernando Pessoa)

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

Referências: Adaptado de *International Commitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in index Médicus.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista d	de Abre	eviatura e Siglas	
Lista d	de Figu	ıras e Tabelas	
Resur	no		
Abstra	act		
1 INTI	RODU	ÇÃO	1
1.1	Asma	Brônquica	2
	1.1.1	Definição	2
	1.1.2	Epidemiologia	5
	1.1.3	Fisiopatogenia da Asma	8
		1.1.3.1 Citocinas Inflamatórias na Asma	13
		1.1.3.2 Remodelamento Brônquico	18
1.2		na colinérgico antiinflamatório, receptores muscarínicos e nicos	24
	1.2.1	α7nAChR e vias de sinalização intracelular	31
	1.2.2	Sistema colinérgico anti-inflamatório e α7nAChR no pulmão	35
1.3	Tratan	nento com agonista do α7nAChR (PNU-282987)	39
1.4	Justific	cativa para estudo	40
2 OBJ	IETIVC	os	42
2.1	Objeti	vo geral	43
2.2	Objeti	vo específico	43
3 MA	ΓERIAL	_ E METÓDOS	44
3.1	Anima	iis	45
3.2	Grupo	s experimentais	45
3.3	Induçã	ão da inflamação pulmonar alérgica crônica	46
3.4	Tratar	nento com PNU-282987 e pré–tratamento com MLA	47
3.5		gens de células no lavado broncoalveolar (LBA) e no le periférico	49
3.6		de citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17 no LBA e IgE no le periférico dosados por ELISA	50
3.7	Estud	os morfométricos	50
	3.7.1	Avaliação de área de edema peribrônquico, de musculatura lisa e de epitélio nas vias aéreas	51

		3.7.2	Avaliação dos eosinófilos nas vias aéreas	52
		3.7.3	Análise do conteúdo de fibras colágenas e elásticas ao redor das vias aéreas	53
		3.7.4	Avaliação do número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1	53
(3.8	do NF	ção da expressão dos receptores α7nAChR, M3mAChR e -kB total, STAT3 total e fosforilada e SOCS3 por Western o homogenato pulmonar	56
(3.9	Anális	e estatística	58
4 R	RES	ULTAI	DOS	59
4	4.1	•	ssão proteica do receptor nicotínico α7nAChR e arínico M3mAChR no pulmão	60
4	4.2	célula	dose resposta do tratamento com PNU-282987 nas s inflamatórias no lavado broncoalveolar de animais pilizados com ovoalbumina	60
4	4.3		do tratamento com PNU-282987 no número de eosinófilos ngue periférico e nas vias aéreas	65
4	4.4		do tratamento com PNU-282987 nos níveis de IgE no e periférico	66
4	4.5		do tratamento com PNU-282987 nos níveis de citocinas L-13, IL-17 e IL-10 no lavado broncoalveolar	68
4	4.6		do tratamento com PNU-282987 no remodelamento de éreas	68
4	4.7		do tratamento com PNU-282987 na expressão proteica do s, STAT3, pSTAT3 e SOCS3	74
5 D)IS	CUSSÂ	O <i>i</i>	76
6 C	O	ICLUS	ÃO	89
7 R	REF	ERÊN	CIAS	91

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACh: Acetilcolina

AChR: Receptores de acetilcolina

EGF: Fator de crescimento epidérmico

FceRI: Receptores de alta afinidade

FceRII: Receptores de baixa afinidade

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

GATA3: Fator de transcrição

HMGB1: Proteína do grupo de alta mobilidade

IFN-Y: Interferon gama

IgE: Imunoglobulina E

ILC2: Células linfoides inata tipo 2

ILCLS: Células linfoides inatas

I.P.: Injeção intraperitoneal

Jak-2: Janus quinase 2

LBA: Lavado broncoalveolar

LPS: Lipopossacarídeos

M2AChR: Receptores muscarínicos do tipo 2

M3AChRs: Receptores muscarínicos do tipo 3

mAChRs: Receptores muscarínicos de acetilcolina

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MEC: Matriz extra celular

MLA: metillicaconitine

MMPs: Metaloproteinases

nAChRs: Receptores nicotínicos de acetilcolina

NF-κB: Fator de transcrição nuclear

OVA: Ovoalbumina

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PKC: Proteína quinasse C

PNU: 282987

P-STAT3: STAT3- fosforilada

SNP: Sistema nervoso parassimpático

SNS: Sistema nervoso simpático

SOCS3: Supresssor de citocinas de sinalização 3

STAT3: Transdutor e ativador de transcrição de sinal 3 (STAT3)

TCD4+: Linfócitos TCD4+

Th2: Linfócitos Th2

TIMPs: Inibidores das metaloproteinases

TNF-α: Fator de necrose tumoral

VAChT: Transportador vesicular de acetilcolina

α7nAChR: Receptor nicotínico α7 de acetilcolina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 -	Mapa do mundo de prevalência da asma infantil	6
Figura 2 -	Percentagem de individuos asmáticos por região acima de 18 anos no Brasil	6
Figura 3 -	Papel central da IgE em doenças respiratórias alérgicas	10
Figura 4 -	Descrição geral das funções das citocinas Th2 na patogênese da asma	16
Figura 5 -	Arco Reflexo Sistema colinérgico anti-inflamatório	28
Figura 6 -	Vias de sinalização envolvidas na estimulação α7nAChR	34
Figura 7 -	Protocolo experimental	48
Figura 8 -	Análise Morfométrica	55
Figura 9 -	Expressão proteica de receptores colinérgicos do tipo α7nAChR e M3AChRs no pulmão	63
Figura 10 -	Curva dose resposta ao tratamento com PNU no número de células totais e diferencial celular recuperados no lavado bronco-alveolar	64
Figura 11 -	Eosinófilos no sangue periférico, ao redor das vias aéreas e níveis de anticorpos IgE no sangue	67
Figura 12 -	Níveis de IL-4, IL-13, IL-17 e IL-10 no lavado broncoalveolar dosados por ELISA	71
Figura 13 -	Avaliação do edema peribrônquico, músculo liso e epitélio brônquico avaliados por morfometria no tecido pulmonar	72

Figura14 -	Avaliação do conteúdo de fibras da matriz extracelular ao	
	redor das vias aéreas	73
Figura 15 -	Avaliação da expressão proteica de p65-NF-kB, dos	
	transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3 total	
	(STAT3) e fosforilado (pSTAT3) e do supressor de	
	sinalização de citocina 3 (SOCS-3)	75
Tabela 1 -	Principais citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma	
	(Hamid et al., 2009)	17

RESUMO

Miranda CJCP. Efeito do tratamento com PNU-282987, agonista do receptor colinérgico nicotínico α7, na resposta inflamatória e de remodelamento brônquico em modelo experimental de asma [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 2016.

Introdução: A inflamação constitui um dos fatores mais importantes da fisiopatologia da asma brônquica, caracterizada por uma resposta eosinofílica com produção de citocinas de perfil Th2. A persistência desta inflamação induz no pulmão um processo de reparo associado à redução progressiva da função pulmonar, que nem sempre é revertida pelos tratamentos disponíveis. O sistema colinérgico anti-inflamatório é descrito como um mecanismo neural que suprime a resposta imune e controla a inflamação principalmente pelo efeito da acetilcolina em receptores nicotínicos do tipo α7 (α7nAChR) encontrados em células do sistema imune. A acetilcolina (ACh) exerce um importante efeito na asma e recentemente demonstramos que a redução parcial da liberação da acetilcolina induz per se a inflamação pulmonar. Embora se saiba que os receptores muscarínicos (mAChRs) exercem um efeito pró-inflamatório e broncoconstritor na asma, a ativação de receptores nicotínicos (nAChRs) poderia ter um efeito benéfico reduzindo a inflamação pulmonar, fato demonstrado em modelos de inflamação sistêmica e aguda. O efeito da ativação do α7nAChR na fisiopatologia da asma ainda não está claramente elucidado. **Objetivo:** Investigar o efeito do tratamento com PNU-282987 (PNU), um agonista específico do α7nAChR, em um modelo murino de inflamação alérgica crônica das vias aéreas. Metodologia: Camundongos BALB/c foram submetidos ao protocolo de indução alérgica crônica das vias aéreas com ovoalbumina (OVA) ou salina intraperitoneal (i.p.) e posterior desafios inalatórios. A partir do 22° dia, os animais receberam diariamente tratamento com PNU ou veículo (Ve) até o 28° dia. Foram testadas três doses de PNU (0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg). A fim de evidenciar se o efeito obtido no tratamento com PNU era dependente do receptor α7nAChR, um grupo de animais foi tratado com MLA (antagonista do α7nAChR), previamente ao tratamento com PNU. No 29° dia do protocolo, os animais foram eutanasiados e foram avaliados o número de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) e no sangue, os níveis de citocinas no LBA, a expressão do α7nAChR e mAchRs do tipo 3 (M3) e a ativação do fator de transcrição nuclear κΒ (NF-κΒ) no pulmão. O remodelamento brônquico foi avaliado por morfometria. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA), onde um P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** Houve expressão do α7nAChR e M3 no homogenato de pulmão de animais controle e sensibilizados. Determinamos por meio da redução de eosinófilos que a dose de 0,5 mg/Kg do tratamento com PNU foi a mais efetiva. Assim, observamos que o tratamento com PNU0,5 nos animais sensibilizados reduziu o número de células totais, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos no LBA, assim como número de eosinófilos no sangue periférico e ao redor das vias aéreas. O tratamento com PNU reduziu os níveis de IgE no sangue e as citocinas IL-4, IL-13 e IL-17 no LBA. Todos estes efeitos foram revertido com o pré-tratamento com MLA, exceto para a citocina IL-17. Alem disso, o tratamento com PNU reduziu o remodelamento brônquico (área de edema, de epitélio e de músculo liso e deposição de fibras colágenas) assim como o número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1 ao redor das vias aéreas. No pulmão a expressão do p-65-NF-kB. STAT3 fosforilado e o SOCS3 foram inibidas pelo PNU. Conclusão: Estes dados claramente demonstram que o α7nAChR está envolvido no controle da resposta inflamatória pulmonar alérgica e de remodelamento brônquico em modelo experimental de asma alérgica e portanto é um novo alvo com potencial terapêutico a ser explorado na fisiopatologia da asma brônquica.

Descritores: Asma, receptor nicotínico de acetilcolina alpha7; modelos animais; camundongos; PNU-282987; receptores colinérgicos.

ABSTRACT

Miranda CJCP. Effects of PNU-282987 treatment, an agonist of α7 nicotinic receptor, in inflammatory response and airway remodeling in an experimental model of asthma [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Background: Inflammation is one of the most important features in asthma pathophysiology, characterized by eosinophilic response with production of Th2 cytokine profile. The persistence of this inflammation can induce a lung repair process associated with a progressive reduction in lung function, which is not always reversed by available treatments. The anti-inflammatory cholinergic system was described as a neural mechanism that suppresses the immune response and controls inflammation mainly by the activaction of acetylcholine α7 nicotinic receptors (α7nAChR) found on immune cells. Acetylcholine (ACh) is an important mediator in asthma and we recently demonstrated that partial reduction on ACh release induced lung inflammation per se. Although it is known that muscarinic receptors (mAChRs) has a pro-inflammatory action and causes bronchoconstriction in asthma, the activation of nicotinic receptors (nAChRs) could have a beneficial effect reducing pulmonary inflammation as demonstrated in models of acute and systemic inflammation. The effects of α7nAChR activation in the pathophysiology of asthma have not been clearly elucidated. Aim: To investigate the effects of PNU-282987 (PNU) treatment, a specific α7nAChR agonist, in a murine model of chronic allergic airway inflammation. **Methods:** BALB/c mice were subjected to a protocol of chronic allergic inflammation induced by intraperitoneal ovalbumin (OVA) or saline and subsequent challenges with inhalation. From the 22th day, the animals daily received PNU or vehicle (Ve) until the 28th day. PNU were tested in three differents doses (0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg). In order to demonstrate that the effects obtained by PNU treatment was dependent on α7nAChR, a group of animals was treated with MLA (antagonist of α 7nAChR) prior to the PNU treatment. On the 29th day of the protocol, the animals were euthanised and the number of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage fluid(BALF) fluid and blood, cytokine levels in BALF, the expression of α7nAChR and mAChRs type 3 (M3), and activation of nuclear transcription factor κB (NF-κB) in the lung were evaluated. Bronchial remodeling was assessed by morfometric methods. Statistical analyses were performed using the SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA) and P<0.05 is considered statistically significant. Results: a7nAChR and M3 expression was detected in control and sensitized lung homogenate. The most effective dose of PNU treatment was 0.5 mg/kg evaluated by the effects on eosinophil reduction. Thus, we observed that treatment with PNU0,5 reduced the number of total cells, eosinophils, neutrophils, macrophages and lymphocytes in BALF, as well as number of eosinophils in peripheral blood and around the airways of sensitized animals. The treatment with PNU also reduced IgE levels in the blood, and cytokines IL-4, IL-13 and IL-17 in BALF. All these effects were reversed by pretreatment with MLA, except for IL-17 cytokine. Furthermore, treatment with PNU reduced bronchial remodeling (edema, epithelium and smooth muscle area and airway collagen deposition) as well as the number of positive cells for MMP-9 and TIMP-1 around the airways. The lung p-65-NF-kB, phosphorylated STAT3 and the SOCS3 expression were inhibited by PNU-282987. Conclusion: These data clearly demonstrate that the α7nAChR is involved in the control of allergic pulmonary inflammatory response and in bronchial remodeling in an experimental model of allergic asthma and it can be a new target with therapeutic potential to be explored in the pathophysiology of asthma.

Descriptors: Asthma; alpha7 nicotinic acetylcholine receptor; models; animal; mice PNU-282987; receptors; cholinergic.

1

INTRODUÇÃO

1.1 Asma Brônquica

1.1.1 Definição

A asma brônquica é uma doença pulmonar que acompanha o individuo ao longo de sua vida com alguns períodos de remissão. Apesar de ser considerada uma condição heterogênea que reverte espontaneamente ou com tratamento, a asma deve estar sob constante supervisão já que quando mal controlada pode deflagrar graves limites a qualidade de vida do individuo e ser algumas vezes fatal ⁽¹⁾.

As doenças para serem consideradas como tal costumam seguir um padrão no que tange a sua apresentação clínica, mudanças estruturais e funcionais do órgão acometido. Desta forma, a apresentação clínica da asma vem sendo reconhecida pelos sintomas respiratórios ⁽²⁾, redução da função pulmonar ⁽³⁾, inflamação persistente das vias aéreas e mudanças na histoarquitetura do pulmão mais conhecido como remodelamento brônquico ^(4,5). Além dessas apresentações clínicas tradicionais a asma atualmente é considerada uma síndrome, ou ao menos uma doença com diversos fenótipos ^(6,7), que incluem a asma alérgica, grave ou resistente a esteróide ⁽⁸⁾, asma induzida por poluentes ambientais ⁽⁹⁾, exercícios físicos ⁽¹⁰⁾, obesidade ⁽¹¹⁾, infecções virais ⁽¹²⁾ e fumaça do cigarro ⁽¹³⁾.

A identificação dos fenótipos da asma permite uma melhor compreensão de sua patologia, da resposta terapêutica e prognóstico ⁽⁷⁾. Por exemplo, tem

sido mostrado que o tratamento inalatório com glicorticóides, em pacientes com inflamação eosinofílica das vias aéreas, resulta em uma melhor resposta a curto prazo em comparação com os pacientes sem inflamação eosinofílica ⁽¹⁴⁾.

A síndrome da asma é caracterizada pela obstrução das vias aéreas, hiperresponsividade e inflamação crônica, entretanto correlações destas características clássicas com os sintomas são muitas vezes fracas ou até mesmo ausentes (15, 16). Contudo, desde as primeiras diretrizes para o manejo da asma (17), o objetivo do tratamento tem sido reduzir os sintomas, melhorar a função pulmonar e prevenir exarcebações. Até os dias atuais não há evidência concreta de que a monitorização da asma baseada no controle de biomarcadores da inflamação das vias aéreas e/ou nas medidas da função pulmonar são superiores ao manejo da asma fundamentada exclusivamente no controle dos sintomas. Em alguns casos particulares, avaliar as características fenotípicas individuais podem trazer melhores resultados para o tratamento (18, 19)

Definir a asma tem sido complexo e controverso, uma vez que a asma é mais reconhecida na atualidade como uma síndrome clínica ao invés de uma única doença. Além disso, a asma possui etiologia multifatorial e muitas de suas características patológicas frequentemente descritas não são específicas da asma ⁽²⁰⁾. Assim a definição mais comumente adotada para asma elaborada pela Global Initiave for Asthma ⁽²¹⁾ leva em consideração suas características clínicas e fisiopatológicas, como se segue:

A asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por uma inflamação crônica das vias aéreas. É definida pela história de sintomas respiratórios, tais como sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com limitação do fluxo aéreo expiratório variável.

O diagnóstico da asma se baseia na identificação dos padrões característicos dos sintomas respiratórios como dispneia e chiado, estes sintomas podem variar conforme a idade, intensidade e periodicidade sendo mais frequente à noite ⁽²¹⁾. Assim que os primeiros sintomas respiratórios forem identificados, provas adicionais de apoio diagnóstico como a espirometria devem ser documentadas ⁽²²⁾.

Ao longo dos anos, colaboradores da comunidade científica vêm aprofundando os estudos sobre asma com o objetivo de elaborar tratamentos de amplo espectro que englobam desde estratégias medicamentosas que diminuam risco futuro de exarcebações (23, 24) e minimizem o declíneo da função pulmonar (25) até o controle dos sintomas (26). Terapias não farmacológicas elaboradas em programas de conscientização onde o individuo asmático automonitora seus sintomas e estabelece uma parceria com o cuidador de saúde vem sendo adotadas com sucesso (27). Além disso, tem sido demonstrado com sucesso o benefício do exercício físico aeróbico e orientado para o tratamento não farmacológico dos pacientes asmáticos (28, 29).

Apesar do uso de diversas estratégias terapêuticas, tanto farmacológica como não medicamentosa, a taxa de controle da asma é aquém do esperado em populações adultas ⁽³⁰⁾, particularmente em alguns fenótipos. Além disso, existe uma porcentagem de pacientes que não responde ao tratamento com

corticosteróides ou ainda que desenvolve efeitos adversos ao tratamento, o que justifica a busca por alternativas ou novos alvos terapêuticos.

1.1.2 Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos são afetados pela asma no mundo ⁽²¹⁾, destes a maioria é constituída por crianças ⁽³¹⁾ (Figura 1). A Organização Mundial de Saúde contabiliza 250 mil mortes de pessoas com asma por ano em todo mundo e projeta um crescimento de mais de 100 milhões de indivíduos com asma já para a próxima década ⁽³²⁾. Embora a prevalência varie de acordo com a região e/ou país, a maioria dos indivíduos com asma vivem em países em desenvolvimento ^(21, 33).

Isto talvez possa ser explicado pela hipótese da "Teoria da Higiene" onde postula-se que a falta de desafios microbianos no início da vida, o que ocorre em estilos de vida moderno, aumenta a probabilidade de crianças atópicas desenvolverem respostas Th2, frente a uma variedade de estímulos do ambiente, justificando assim o aumento da prevalência da asma em grandes centros urbanos ⁽³⁴⁾. Esse aumento da prevalência é preocupante, devido ao fato que as terapias atuais disponíveis não são eficazes em controlar alguns quadros mais graves do espectro da doença.

No Brasil, segundo Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos (Figura 2). Destes 3,9 milhões são

do sexo feminimo e 2,4 milhões do sexo masculino, ou seja, prevalência de 39% a mais entre as mulheres ⁽³²⁾.



Figura 1 - Mapa do mundo de prevalência da asma infantil (21)

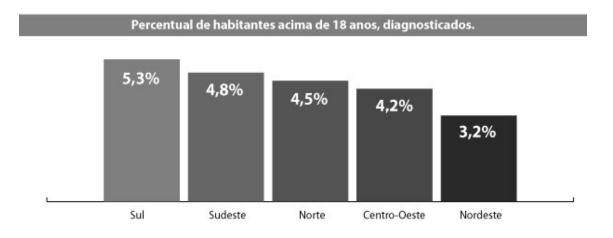


Figura 2 - Percentagem de indivíduos asmáticos por região acima de 18 anos no Brasil ⁽³²⁾

A asma onera os cofres públicos brasileiros, sendo responsável por um número representativo de internações hospitalares. Somente no ano de 2014, entre os períodos de janeiro a novembro, foram realizadas, segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH), 105,5 mil internações por asma originando um custo de 57,2 milhões para a rede pública do país (32). Contudo, avaliando dados dos anos anteriores, observamos queda no número de internações no Brasil na ordem de 51%, entre os anos 2000 e 2010, que apresentava em média 397.333 internações comparadas a 192.601, respectivamente. Os fatores responsáveis para esta redução parece estar relacionados a implementação de programas para o tratamento da asma como a oferta de medicação gratuita aos pacientes pelo SUS (35).

Atualmente não há cura para asma e apesar dos esforços em conjunto na busca pela melhor estratagéria de tratamento sua morbidade ainda é elevada ⁽³⁶⁾, com consequências dramáticas na qualidade de vida, perda da produtividade no local de trabalho e absenteísmo escolar. Em um cenário mais grave, embora incomum, o individuo asmático pode culminar para o óbito em casos de asma fatal onde geralmente o paciente apresentava sintomas graves recorrentes, declínio da função pulmonar, admissões frequentes nos hospitais, uso inadivertido da medicação e subestimação da gravidade da doença ⁽³⁷⁾.

1.1.3 Fisiopatogenia da Asma

Embora existam diversos fenótipos para asma, a forma alérgica é a que tem recebido maior atenção por parte dos pesquisadores nos últimos anos. O processo de sensibilização é a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro da asma alérgica. Inicialmente alérgenos inalados são captados e processados por células apresentadoras de antígenos, como as células dentríticas, que estão presentes na mucosa brônquica. Estas células são capazes de reconhecer, processar o antígeno e apresentar seus fragmentos peptídios ligados à molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) aos linfócitos T CD4^{+ (6, 38)}.

Os linfócitos T CD4⁺, em indivíduos com predisposição genética, se diferenciam em linfócitos Th2 que produzem citocinas nos pulmões dos pacientes asmáticos, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (39). As citocinas produzidas pelos linfócitos T fazem com que estas células estimulem a produção da imunoglobulina E (3) por linfócitos B (fase de sensibilização alérgica), além de estimular a proliferação de mastócitos, ativação e aumento da sobrevida de eosinófilos. De fato a IgE é uma das principais moléculas associadas a patogênese das alergias, tendo um papel central na indução e manutenção da inflamação alérgica (40). Além disso, estudos epidemiológicos e observações clínicas apontam uma importante correlação entre os níveis de IgE e a gravidade da asma (41). Após a fase de sensibilização do indivíduo e frente a novas exposições aos antígenos, a IgE liga-se aos receptores de alta afinidade

expressos em mastócitos e basófilos ⁽⁴²⁾, o que induz a desgranulação mastocitária e consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios.

Dullaers et al. (2012) ⁽⁴⁰⁾ descreveram o papel central do anticorpo IgE na indução e manutenção da inflamação alérgica (Figura 3). Entretanto, outro estudo sugere que a asma alérgica desencadeada por resposta Th2 pode ocorrer mesmo sem a participação do anticorpo IgE ⁽⁴³⁾.

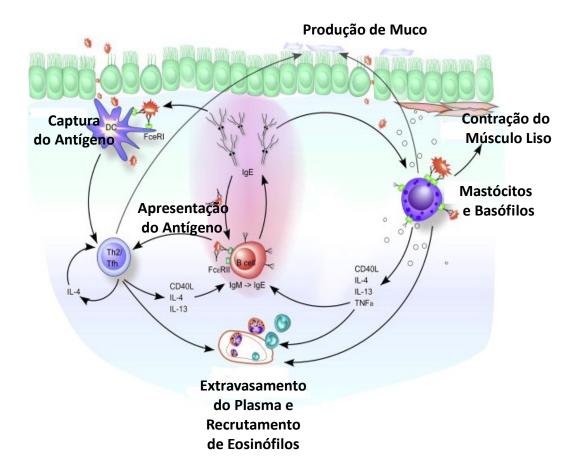


Figura 3 -Papel central da IgE em doenças respiratórias alérgicas. As células dentríticas capturam os antígenos inalados o que estimula a diferenciação de linfócitos Th2. Além do recrutamento de eosinófilos, os linfócitos Th2, via liberação de citocinas IL-4 e IL-13, estimulam a produção de IgE pelos linfócitos B. A IgE produzida na mucosa se liga aos receptores de alta afinidade (FceRI) e baixa afinidade (FceRII) em células presentes na mucosa das vias aéreas. A ativação dos receptores de alta afinidade em mastócitos e basófilos leva à desgranulação destas células, seguidas da síntese de mediadores e citocinas inflamatórias, que causam os sintomas da hipersensibilidade imediata, tais como extravasamento do plasma e contração do músculo liso. A produção de mediadores e citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, e TNF-α) inicia a resposta da fase tardia com ativação e recrutamento das células inflamatórias tais como monócitos e eosinófilos. IL-4 e IL-13 ainda causam hiperplasia das células caliciformes e produção do excesso de muco. O aumento dos níveis locais de IgE induz a expressão dos FceRI em células dentríticas e estabiliza a FceRII em células B. Isto permite que ambos os tipos de células propiciem o ambiente favorável a resposta Th2

Herxheimer et al. (1952) (44) descreveram as duas fases distintas da resposta asmática após inalação do alérgeno. Na primeira fase, chamada de imediata (early phase response), ocorre contração do músculo liso, edema de mucosa, produção de muco e aumento da permeabilidade vascular que podem se estender por até 3hs após o contato com o alérgeno. Após esta fase, pode ocorrer uma resposta mais tardia (late phase response), que se inicia de 3 à 6hs após a exposição ao alergeno e com a chegada de leucócitos recrutados (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). De maneira geral a fase imediata é caracterizada pela hiperresponsividade brônquico, enquanto a fase tardia é marcada principalmente pelo grande influxo de eosinófilos para as vias aéreas e liberação de mediadores pró-inflamatórios (38). Desta forma, diversas células tais como células epiteliais, células dentríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T e B, contribuem de maneira efetiva para fisiopatogenêse da asma, sendo os mastócitos, linfócitos Th2 e os eosinófilos as células mais importantes (45).

Os eosinófilos são células características da inflamação alérgica. A função biológica do eosinófilo na asma é bastante reconhecida e está associada a inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e obstrução ao fluxo aéreo (45), o que ocorre tanto em pacientes asmáticos como em modelos experimentais de asma. Durante as respostas alérgicas de perfil Th2, os eosinófilos são recrutados a partir da medula óssea e do sangue periférico para os locais da inflamação (46).

O papel pró-inflamatório do eosinófilo na asma está relacionado a produção de cisteinil leucotrienos, bem como citocinas Th1 (interferon-Y e IL-2)

e citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (47). A relação dos eosinófilos com a hiperresponsividade brônquica (48, 49), possivelmente ocorre devido a produção de IL-13, de cisteinil leucotrienos e a liberação da proteína básica principal e a proteína catiônica eosinofílica pelos seus grânulos, as quais causam dano ao epitélio e perpetuam a inflamação das vias aéreas. Além disso, os eosinófilos contribuem para ativação e proliferação de células T em tecido humano e também em modelo experimental de asma (50).

Nos últimos anos tornou-se cada vez mais evidente o fato de que alguns asmáticos apresentam importante inflamação neutrofílica. Atualmente não está claro se a asma neutrofílica representa uma forma única de asma ou se é um estágio diferente de gravidade ⁽⁵¹⁾, especialmente se considerarmos que o tratamento clássico com glucorticóides poderia prolongar a sobrevivência dos neutrófilos ⁽⁵²⁾.

Na busca de encontrar terapias mais eficazes e compreender melhor a patogênese da asma, modelos experimentais de asma vêm sendo utilizados com frequência pelos pesquisadores (53, 54). Os primeiros modelos experimentais de asma foram desenvolvidos por volta do início dos anos 90. O estudo em modelos murinos, que mimetizam algumas características da asma humana, é excelente por tornar possível a avaliação dos processos de sensibilização à alérgenos, corroborar na compreensão da fisiopatogênese da asma e testar novas opções de tratamento (53, 54), além do baixo custo em obter camundongos e da grande disponibilidade de anticorpos e animais modificados geneticamente.

Considerando o tratamento da asma, atualmente sabe-se que drogas como os corticoides inalados em baixas doses reduzem em 50% o risco de morte ⁽⁵⁵⁾, bem como 1/3 das hospitalizações ⁽⁵⁶⁾. Alguns estudos mostraram que os sintomas podem ser reduzidos por ação do β2-agonista ⁽⁵⁷⁾, corticoide inalatório de manutenção/formeterol ⁽¹⁾ e anti-interleucina IL-5 ⁽⁵⁸⁾.

Embora os tratamentos atuais sejam capazes de controlar os sintomas e melhorar a função pulmonar na maioria dos pacientes com quadro agudo, muitas vezes exacerbações graves ocorrem e podem contribuir significativamente para morbidade e mortalidade. Nestes casos, o que costuma ocorrer na prática clínica é intensificar o tratamento, o que aumenta o risco de efeitos adversos tendo impacto dramático sob a qualidade de vida do indivíduo asmático além do ônus ao erário público.

1.1.3.1 Citocinas Inflamatórias na Asma

As citocinas modulam inúmeras atividades funcionais das células e dos tecidos, têm a capacidade de mediar interações diretas das células e de atuar como fator de sobrevivência celular, prevenindo apoptose. O equilíbrio entre a síntese e liberação das citocinas é um componente essencial do sistema imune inato, uma vez que produzidas em excesso, as citocinas, podem gerar uma inflamação sistêmica generalizada. Podem ser produzidas por diversos tipos de células inflamatórias, tais como linfócitos T e eosinófilos, e estruturais, incluindo células endoteliais, epiteliais e fibroblastos ⁽⁵⁹⁾. Compreender a ação das citocinas nas células do sistema imune podem fornecer *insights* importantes

para selecionar novas estratégias terapêuticas que possam prevenir exarcebações e o curso natural da doença.

As citocinas comumente relacionadas a fisiopatogenêse da asma são sintetizadas pelas células de perfil Th2, tais como: IL-4, IL-5, IL-13 (39, 40). Citamos as principais funções destas citocinas para o processo inflamatório alérgico: IL-4 promove a troca de isotipo e produção de IgE nos linfócitos B (60), IL-5 é responsável pela maturação, ativação e sobrevivência do eosinófilos (61) e IL-13 induz a produção de muco pela diferenciação e hiperplasia das células epiteliais secretoras especializadas, inflamação da vias aéreas e hiperresponsividade (45, 62, 63).

Estudos utilizando murinos deficientes de IL-4 mostraram que o desenvolvimento da inflamação alérgica induzida pelo antígeno foi significativamente reduzida nos animais com deficiência de IL-4 em comparação com o murino do tipo selvagem ⁽⁶⁴⁾. Em outro estudo, agora com ensaio clínico do receptor solúvel de IL-4 (IL-4R) que neutraliza IL-4, mostrou melhora terapêutica para asma moderadamente grave ⁽⁶⁵⁾.

A citocina IL-13 possui um papel central na resposta alérgica por meio de suas ações sobre o epitélio e células musculares lisas. A importância de IL-13 foi evidenciada em um desafio com antigênico praticado em murinos deficientes de IL-13, tais animais falharam em produzir hiperresponsividade e muco, mesma na presença continuada de IL-4, IL-5 e inflamação das vias aéreas (63). Apesar da inegável importância das células Th2 para perpetuação da cascata inflamatória na asma, atualmente sabemos que respostas alérgicas

podem ser induzidas na ausência de células T ou B, sugerindo a importância de outros tipos de células.

Recentemente, tem se destacado a relevância das células linfoides inatas (ILCLs) e sua respectiva subpopulação ILC2 para a imunorregulação das citocinas em doenças alérgicas ⁽⁶⁶⁾. Por sua vez, as células linfóides inatas (ILC2) podem representar a ligação procurada entre a estimulação da célula epitelial e o início da resposta Th2 ^(67, 68). Estas células foram descobertas em humanos e camundongos de maneira independente por diversos grupos. As ILC2 são grandes produtoras de IL-5 e IL-13 em respostas a ativação das células epiteliais ⁽⁶⁹⁾. Naturalmente tanto as células Th2 quanto as ILCs, por meio da produção das citocinas, são potencialmente importantes para a manutenção das respostas alérgicas (Figura 4) ⁽⁷⁰⁾.

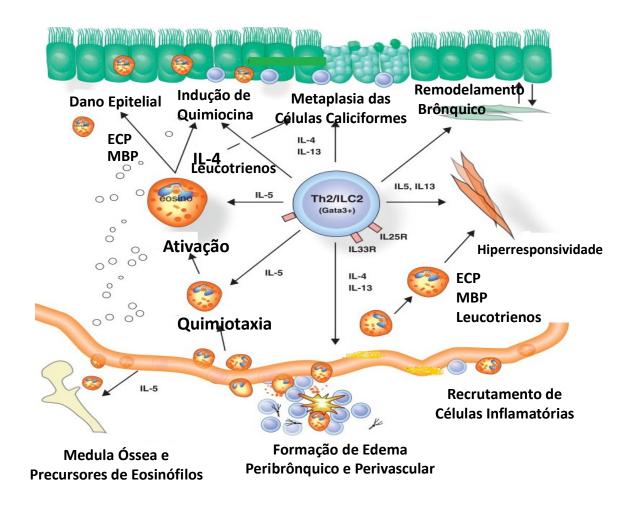


Figura 4 - Descrição geral das funções das citocinas Th2 na patogênese da asma. Observamos uma considerável sobreposição de funções entre as células Th2 e as células linfóides inatas tipo 2 (ILC2). Os linfócitos Th2 compartilham o fator de transcrição GATA3 como as ILC2, este fator de transcrição é conhecido como mestre para os linfócitos T CD4 + Th2, onde se controla a produção das citocinas de perfil Th2: IL-4, IL-5 e IL-13. O fator de transcrição GATA3 dirige a expressão de citocinas Th2 em ambos os tipos de células. Ambas as células também possuem função em conjunto para os efeitos dirigidos por leucotrienos, proteína básica principal (MBP) e proteína catiônica eosinofílica (ECP), os quais são importantes mediadores liberados pelos eosinófilos. De modo geral as citocinas liberadas pelos linfócitos Th2 e ILC2 participam de modo semelhante das características importantes na patogênese da asma (70)

Outras citocinas que podemos ressaltar são as pró-inflamatórias [IL-1 β , IL-6, IL-11 e fator de necrose tumoral (TNF- α)], citocinas antiinflamatórias (IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-18), fatores de crescimento [fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)], TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF)] e citocinas quimiotáticas ou quimiocinas (RANTES, Eotaxina e IL-8) (59). A Tabela 1 resume as principais citocinas envolvidas na asma e suas respectivas funções.

Tabela 1 - Principais citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma ⁽⁵⁹⁾

Citocina	Atividade biológica
IFN-γ	Citocina mais importante na imunidade mediada por células; controla o equilíbrio Th1/Th2; inibibe a resposta alergica
IL-10	Antiinflamatória
IL-13	Produção de IgE, inflamação, hipersecreção de muco e eosinofilia
IL-4	Regulação do crescimento, diferenciação, ativação e função de células B
IL-5	Eosinofilia e regulação de eosinófilos
TGF-β	Remodelamento; citocina pró-fibrótica; quimiotática para muitas células inflamatórias

As células de perfil Th2 e sua citocinas orquestram as principais características patognomônicas da asma. Todavia células Th17 (uma população de células TCD4⁺ que secretam IL-17A, IL-17F e IL-22), estão envolvidas principalmente na asma grave onde o acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas é característico (71-73). Além disso, foi demonstrado que a IL-17 é

expressa nas vias aéreas de pacientes com asma ⁽⁷⁴⁾ e que sua expressão está correlacionada com a gravidade da asma ⁽⁷⁵⁾.

Embora as células Th17 estejam envolvidas na inflamação neutrófilica das vias aéreas, Hellings et al. (2003) (72) demonstraram que camundongos deficientes de IL-17 submetidos ao protocolo de asma exibem redução não apenas de neutrófilos, mas também de eosinófilos. É importante ressaltar que a citocina IL-23 é necessária para a ação patogênica das células Th17 (76). Além disso, o eixo IL-23-Th17 desempenha um papel crucial no desenvolvimento de doenças inflamatórias e está envolvido na regulação da inflamação alérgica, e também pode colaborar com o recrutamento eosinofílico, atuando mesmo onde células Th2 desempenham papel principal (77, 78).

1.1.3.2 Remodelamento Brônquico

A persistência do processo inflamatório ao longo do tempo e o desencadeamento de respostas tardias na asma podem culminar para um processo de reparo crônico de natureza progressiva, conhecido como remodelamento pulmonar ⁽⁷⁹⁾. Usamos o termo remodelamento quando nos referimos às mudanças na composição, quantidade e organização dos componentes celulares e moleculares da parede das vias aéreas na asma ⁽⁸⁰⁾. Essas mudanças estruturais nas vias aéreas, segundo Vignola et al. (2003) ⁽⁸¹⁾ e James e Wenzel (2007) ⁽³⁷⁾, são desencadeadas por diversos fatores que culminam para o aumento da espessura da parede das vias aéreas, tais como:

- Espessamento da membrana basal: Subsequente do aumento da deposição das fibras colágenas, tenascina e fibronectina, os quais são ativados pelos miofibroblastos e cursam para o processo de fibrose subepitelial;
- Vasos sanguíneos: Em indivíduos asmáticos é obervada uma mudança no aumento da vascularidade, vasodilatação e insuficiência vascular, bem como um aumento do número e tamanho dos vasos brônquico;
- Matriz extracelular: Composto por fibras do sistema colágeno, fibras do sistema elástico, fibronectina, proteoglicanos e as substâncias que compõem as membranas basais epiteliais e endoteliais. As alterações mais comumente observadas na matrix extracelular são a quantidade anormal das fibras elásticas, fibras colágenas e proteínas.
- Músculo liso: Ocorre hiperplasia da camada muscular e hipertrofia das fibras e células musculares lisas, contribuindo para o espessamento do músculo liso o que pode acarretar o aumento da matriz extracelular dentro das camadas do músculo liso.

A importância de todas as alterações supracitadas é dimensionada pela expressão clínica que o remodelamento pode exercer na asma, sendo a hiperresponsividade da via aérea e a obstrução ao fluxo aéreo considerado o curso final das alterações estruturais da parede das vias aéreas (37, 82). Contudo, a relação do espessamento da parede da via aérea e a reatividade brônquica ainda não é consenso e alguns dados são conflitantes e poucos consistentes. Niimi et al. (2003) (83) demonstraram que o espessamento da parede das vias aéreas atenua a reatividade brônquica em pacientes com

asma, sugerindo que o processo de reparo seria protetor ao pulmão. Ainda, Nakano et al. (2002) ⁽⁸⁴⁾ acredita que o aumento da espessura da parede das vias aéreas, não está normalmente associado ao estreitamento do lúmen na asma. Por outro lado, Little et al. (2002) ⁽⁸⁵⁾ encontraram correlação direta da reatividade brônguica com o espessamento das vias aéreas.

Quanto a distensibilidade das vias aéreas sua redução tem sido relacionada à espessura da fibrose subepitelial ⁽⁸⁶⁾, ao aumento do número de fibroblastos e a deposição de fibras colágenas ⁽⁸⁷⁾.

Os ciclos repetivos de inflamação, cicatrização e reparo envolvem diversas células inflamatórias, células estruturais e também diversas citocinas e fatores de transcrição. Biopsias brônquicas de pacientes com vias aéreas remodeladas apresentaram aumento ns níveis de citocinas de perfil Th2 e de GATA-3 (88). Corroborando estes dados, animais transgênicos com aumento da expressão de GATA-3, o que favorece desenvolvimento da resposta de perfil Th2, mostraram aumento da fibrose subepitelial e da hiperplasia do músculo liso associado ao aumento de eosinófilos no pulmão (89). A supressão da citocina IL-13 antes do desafio com alérgeno em modelo murino de inflamação de vias aéreas diminuiu o número de células caliciformes e a deposição de fibras colágenas nas vias aéreas (90). As citocinas de perfil Th17 também têm sido relacionadas ao aumento da produção de proteínas da matriz extracelular e da regulação da função do músculo liso (91).

È importante ressaltar o papel do eosinófilo no processo de remodelamento brônquico, visto que este pode proporcionar uma ampla variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (46, 92, 93).

Corraborando com esse fato e sabendo que IL-5 é responsável pela maturação, ativação e sobrevivência dos eosinófilos ⁽⁶¹⁾, Flood-Page et al. (2003) ⁽⁹³⁾ obervaram uma melhoria no remodelamento das vias aéreas em pacientes asmáticos tratados com anti-IL-5.

As células musculares lisas têm sido destacadas como importante na modulação da resposta inflamatória da asma. Estas podem participar da resposta inflamatória crônica das vias aéreas por interação com citocinas Th1 e Th2 para modular a atividade quimiotática para eosinófilos, linfócitos T ativados, monócitos e macrófagos, além de terem o potencial de alterar o ambiente da matriz extracelular e orquestrar eventos-chave no processo de remodelamento crônico das vias aéreas (94).

Alterações estruturais em vias aéreas de asmáticos já foram caracterizadas há décadas no tecido pulmonar, obtidos por meio de autópsia de pacientes que foram a óbito por asma ⁽⁹⁵⁾. No remodelamento pulmonar que ocorre na asma grave ou fatal há espessamento do músculo liso da parede da via aérea com hipertrofia e hiperplasia de fibroblastos ⁽⁹⁶⁾, espessamento da membrana basal subepitelial brônquica ⁽⁹⁷⁾ e proliferação de células do epitélio brônquico ⁽⁹⁸⁾. Em conjunto, todos estes dados sugerem que o remodelamento brônquico pode ser um fator de gravidade da asma.

O processo de remodelamento é controlado pelo equilíbrio dos fatores pró e anti-fibróticos. Dentre estes fatores se destacam as metaloproteinases de matriz (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMP's), que podem ter sua relação alterada na asma. O desequilíbrio de fatores proteolíticos-antiproteolíticos e a secreção inapropriada de várias MMPs por células

inflamatórias ou estruturais fazem parte da fisiopatologia de diversas doenças pulmonares, inclusive da asma.

As metaloproteinases de matriz são enzimas proteolíticas que são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular (MEC), e, assim, desempenhar um papel na migração celular e remodelação dos tecidos. Além disso, elas podem ativar citocinas e quimiocinas, influenciando assim o recrutamento e a função de células inflamatórias. Já as TIMPs são inibidores naturais de MMPs, que podem inibir a ligação ao sítio catalítico das MMPs. O desequilíbrio de MMPs e seus inibidores contribuem para o dano tecidual e algumas das características do remodelamento observadas na asma (81).

A MMP-9 é ativada em todos os processos de remodelamento e reparo, e também em condições inflamatórias. É ainda produzida por células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. A célula mais comumente associada ao aumento da atividade da MMP-9 na via aérea de pacientes com asma é o neutrófilo ⁽⁹⁹⁾.

Os níveis de MMP-9 foram encontrados elevados no escarro de asmáticos desafiados com alérgenos, quando comparados aos seus controles e uma correlação positiva com o número de eosinófilos foi encontrada. Por outro lado, os níveis de TIMP-1 não variaram significativamente (100). Além disso, a MMP-9 foi encontrada em altas concentrações no plasma e no lavado brônquico, associado a uma resposta diminuída do TIMP-1, em pacientes com exacerbação aguda de asma e mal asmático (101, 102). Por isso, a MMP-9 tem sido associada como um marcador da inflamação e do remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma grave (101).

Os estudos em modelos animais são similares aos achados encontrados em indivíduos asmáticos no que se refere à importância da MMP-9 no remodelamento pulmonar da asma. A instilação intranasal de IL-17 em animais, conhecida por promover o recrutamento de neutrófilos, induz a liberação de MMP-9 no fluído do lavado broncoalveolar ⁽⁹⁹⁾. Em outro modelo animal com deficiência de MMP-9 houve redução do infiltrado de células inflamatórias nas vias aéreas e no fluido do lavado broncoalveolar ⁽¹⁰⁰⁾.

Ainda não existe consenso a respeito da seqüência precisa de eventos que ocorrem no processo de remodelamento. Existe controvérsia sobre se os mecanismos inflamatórios levam ao remodelamento das vias aéreas ou se uma alteração intrínseca na parede brônquica é que induz a inflamação crônica (5). O mesmo ocorre em relação à obstrução das vias aéreas e a hiperresponsividade, onde não se sabe se os componentes do remodelamento são prejudiciais, ou se representam uma resposta protetora à broncoconstrição. Alguns autores referem que sem o remodelamento o paciente seria ainda mais acometido pelos sintomas e teria a função pulmonar mais prejudicada (37). Elucidar os mecanismos envolvidos no remodelamento, incluindo a função das células estruturais na asma pode abrir novos horizontes para intervenções terapêuticas mais efetivas (79).

1.2 Sistema colinérgico anti-inflamatório, receptores muscarínicos e nicotínicos

A causa base da inflamação e seus efeitos na saúde humana é motivo de incessantes pesquisas, que nos trás uma compreensão mais arraigada do processo inflamatório e principalmente de como ele está associado a muitas doenças debilitantes como diabetes, obesidade, artrites, câncer, fibrose cística, asma, entre outras (103).

A inflamação é uma resposta fisiológica frente à invasão de um patógeno e/ou injúria tecidual. Qualquer órgão do corpo pode se tornar inflamado, envolvendo uma cascata de eventos que começa com uma resposta localizada e altamente regulada, com o objetivo de neutralizar e eliminar o agente agressor, além de promover o reparo aos danos causados (104). O órgão ou tecido, ao sofrer uma injúria causada por trauma, infecção, isquemia ou hipersensibilidade imunólogica, irá desencadear uma resposta inflamatória que via de regra é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, moléculas de adesão, mediadores vasoativos, entre outros (105).

Embora, as respostas inflamatórias aos danos teciduais tenham um efeito reparador, uma inflamação persistente terá um efeito devastador que pode levar à debilidade e a até a morte. Neste sentido, é necessário um ajuste equilibrado entre a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias. Quando produzidas em excesso, as citocinas podem acarretar um panorama favorável para uma séria de doenças crônicas, inclusive a asma (106). A magnitude da resposta inflamatória é finamente controlada e autorregulada por uma série de

mecanismos, dentre eles as interações do sistema nervoso central e imune que são fundamentais para a modulação da resposta imune inata frente ao processo inflamatório (107).

O cérebro e o sistema imunológico são conectados pelo sistema nervoso autônomo ⁽⁶⁰⁾ que é composto pelo sistema simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP). O papel do SNS na modulação dos processos inflamatórios já é bem definido e tem funções pró ou anti-inflamatórias, dependendo de fatores como a concentração de neurotransmissores, a afinidade do receptor, tempo de atividade do SNS em relação ao curso da inflamação e outros ^(108, 109).

De modo contrário ao papel bem definido do SNS na doença, o controle parassimpático, da inflamação, só foi descrito por Borovikova et al. (2000) (110), que descreve o arco reflexo da inflamação como responsável por transmitir informações sobre o estado imunológico da periferia para o sistema nervoso central com a finalidade de regular a inflamação, evidenciando a comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e imunitário.

O arco reflexo da inflamação consiste em uma via neural aferente sensorial que detecta os produtos moleculares da lesão, infecção e inflamação, e um arco neural motor eferente que transmite os sinais para modular as respostas imunes. Especificamente ao arco eferente do reflexo inflamatório é o que denominamos de via colinérgica anti-inflamatória, um mecanismo neural composto pelo nervo vago parassimpático e seu principal neurotransmissor a acetilcolina (ACh).

Quimicamente a ACh é um éster de ácido acético e colina, cuja simplicidade estrutural subestima a complexidade das ações que exerce. A ACh é liberada pelo SNA nas fibras pré e pós-ganglionares do sistema nervoso colinérgico (111). Ao ser liberada a ACh interege com duas classes principais de receptores de acetilcolina (AChR): Receptores nicotínico de acetilcolina (nAChRs) e os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs). É importante ressaltar que as funções da ACh serão determinadas dependendo da interação com o seu respectivo receptor.

Os receptores muscarínicos são do tipo sepentiforme, transpassam a membrana sete vezes e estão acoplados a proteína G (112) que compõem cinco subtipos (M1-M5). O controle da liberação da ACh pelo nervo vago envolve os receptores muscarínicos autoinibitórios M2, expressos em fibras nervosas pósganglionares.

Nos pulmões a ACh ao interagir como os receptores muscarínicos M2 (M2AChR), inibe a liberação da ACh em um mecanismo de retroalimentação negativa diminuindo assim a bronconstrição (113), contudo na asma a ação da ACh nos receptores muscarínicos envolve a disfunção autoinibitória do receptor muscarínico M2. A disfunção deste receptor irá aumentar a liberação de ACh nas vias aéreas em terminações nervosas parassimpáticas (114). O aumento da ACh circulante culminará com interações destas e os receptores muscarínicos M3, tendo como resultado o aumento da produção de muco e da contração do musculo liso (115).

De outro modo, os nAChRs são do tipo canais iônicos regulados por ligantes e podem ser compostos pela combinação de 17 diferentes tipos de

subunidades (A1-10, β 1-4, δ , ϵ , γ) ⁽¹⁰⁶⁾. No cérebro, os nAChRs desempenham um importante papel na atividade sináptica cerebral e na modulação das funções celulares ⁽¹¹⁶⁾, enquanto que nos músculos estão envolvidos na ativação neuronal de espasmos musculares ⁽¹¹⁷⁾.

Em contraste ao observado dos efeitos deletérios da ACh no pulmão quando atua via receptores muscarínicos, o papel da ACh em receptores nicotínicos na resposta inflamatória pulmonar parece ter um efeito benéfico, sugerindo que este receptor está envolvida no sistema colinérgico anti-inflamatório.

Esquematicamente durante o processo inflamatório, as fibras sensitivas do nervo vago, as quais atuam em vários compontentes e/ou órgãos do sistema imunológico (sistema retículo endotelial) como fígado, pulmão, baço, rins e intestino, iniciam uma resposta reflexa estimulada pela liberação de mediadores químicos (TNF-α e IL-1-β) oriundos do sítio inflamatório (118). Estes estímulos são transmitidos ao sistema nervoso central, via braço aferente vagal, fazem sinapse no núcleo do trato solitário que, juntamente com outras estruturas centrais, ativam os neurônios vagais eferentes, estes por sua vez liberam ACh (119) que ao se ligar aos receptores nícoticos α7 expressos em macrófagos e outros tipos celulares, inibem a síntese de citocinas pró-inflamatória no baço, prevenindo o dano tecidual, e reestabelecendo assim a homeostasia (118, 119) (Figura 5).

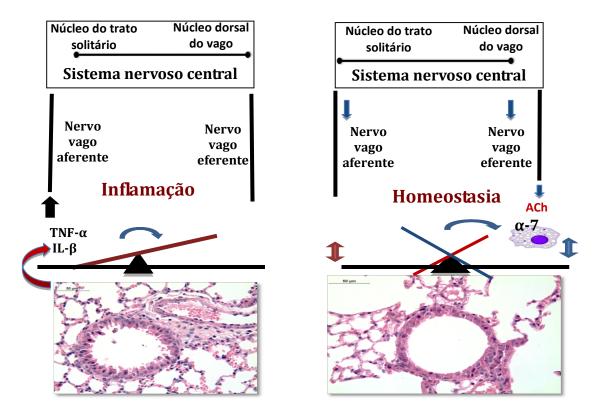


Figura 5 -Arco Reflexo - Sistema colinérgico antiinflamatório. Durante o processso inflamatório, aqui esquematicamente representado por fotomicrografias da via aérea em modelo animal de indução alérgica crônica, ocorre a liberação de citocinas do sítio inflamatório, as quais são necessárias para realizar o reparo tecidual, porém um desequilibrio entre a produção de citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória pode liberar de forma desordenada mediadores pró-inflamatórios como TNF-α e IL-β no foco inflamatório. Estes mediadores funcionam como verdadeiros sensores da inflamação e sinalizam via fibras sensoriais vagais aferentes a informação de que há um dano tecidual periférico. Esta informação advinda de uma injúria tecidual fará sinapses com o núcleo do trato solitário e núcleo dorsal do vago gerando uma reposta eferente. A isto chamamos de comunicação bidirecional ou ainda de interação da resposta neuro-imune-inata, ou seja, a comunicação entre o sistema imune inato e o sistema nervoso central. Durante a resposta eferente o sistema nervoso central envia a informação de volta para o sítio inflamatório liberando pelas fibras eferentes do nervo vago seu principal neurotransmissor a acetilcolina que ao interagir com o receptor nicotinico α-7 expresso em macrófagos e outros tipos celulares inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias reestabelecendo assim a homeostasia (120)

Em geral, há duas grandes vias de comunicação responsáveis por transmitir a informação do estado imunológico periférico para o SNC: Neural (nervos sensoriais) e não neuronal ⁽¹²¹⁾, entretanto ambas as vias estão provavelmente envolvidas na mediação imune periférica para comunicação com o cérebro, e cada uma das vias poderá ser ativada individualmente ou em conjunto, com base em numerosos fatores que incluem; o tipo de antígeno ou estimulante do sistema imune, a dose ou concentração do estimulante imune, e a via de administração do antígeno ⁽¹²²⁾.

A via não neuronal, também retratada como sistema colinérgico não neuronal, expressa receptores de ACh do tipo nicotínico em células do sistema imune inato, as quais liberam ACh para exercer suas respectivas funções. De modo geral, os nAChRs são reconhecidos por mediar a neurotransmissão química em neurônios, gânglios, interneurônios e a placa motora, enquanto os mAChRs medeiam a neutrotransmissão química em neurônios e órgãos efetores, tais como coração, fibras musculares lisas e glândulas (123).

Desde a descoberta da via colinérgica anti-inflamatória, sucessivos estudos clínicos e experimentais vêm incessantemente sendo realizados utilizando diferentes modelos de ativação ou inibição da via colinérgica anti-inflamatória, sendo por estimulação elétrica ou inibição do nervo vago (110, 124, 125), vagotomia (126, 127) ou uso de fármacos que inibam a acetilcolinesterase ou agonistas e/ou antagonistas de receptores específicos (126, 128-130).

Corraborando com o papel anti-inflamatório do reflexo da inflamação, Huston et al. (2007) (131) mostraram que a estimulação elétrica no nervo vago eferente diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo

experimetal de endotoxemia letal, inibiu a resposta inflamatória aguda ao choque hipovolêmico agudo hemorrágico ⁽¹³²⁾ e diminuiu a inflamação intestinal induzida experimentalmente no íleo ⁽¹³³⁾. Além disso Li et al. (2010) ⁽¹²⁷⁾ mostraram que a vagotomia cervical aumentou a expressão de TNF-α, IL-6 e a proteína do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) detectados por Elisa em modelo de artrite em camundongos. Corroborando a importância da acetilcolina na regulação da inflamação, Leite et al. (2016) ⁽¹³⁴⁾ demonstraram que animais com deficiência colinérgica por redução de VAChT eram mais susceptiveis a inflamação sistêmica induzida por LPS.

O α7nAChR (do inglês, α7 nicotinic acetycholine receptor, receptor nicotínico α7 de acetilcolina) está expresso em células do sistema imune como macrófagos, eosinóliflos, mastócitos, basófilos, linfócitos T e B, células dendríticas, inclusive em células epiteliais alveolares (130, 135-139). Wang et al. (2003)(139) mostraram que camundongos deficientes do α7nAChR foram incapazes de inibir a produção de citocinas inflamatórias após estimulação do nervo vago, tomando como fato desde então que, o α7nAChR é essencial para inibição da síntese de citocinas por meio da via colinérgica anti-inflamatória.

Pesquisas em Knockout para α7 mostraram claramente, *in vivo*, o importante papel dessa subunidade na via colinérgica anti-inflamatória: Nesses animais, mesmo após realizar a estimulação elétrica do nervo vago, não se oberva significativa redução de citocinas no baço e no fígado (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8 e HMGB1) (139) e macrófagos isolados desses animais não respondem a estimulação dos agonistas (acetilcolina e nicotina) do α-7, e quando

estimulados, continuam a produzir TNF-α mesmo na presença desses ligantes (128)

Descoberta a identidade do receptor de acetilcolina que medeia os sinais do vago, até então desconhecida, diversos estudos se concentraram em estudar o potencial terapêutico α7nAChR. Assim a estimulação do α7nAChR tem sido proposto como potencial alvo para as propriedades anti-inflamatórias em diversos modelos animais de inflamação, tais como pancreatite ⁽¹²⁶⁾, sepsis ^(128, 130) e peritonite bacteriana ⁽¹⁴⁰⁾.

1.2.1 α7nAChR e vias de sinalização intracelular

O subtipo α7nAChR apresenta uma permeabilidade mais elevada para os íons de cálcio em relação aos outros nAChR. Como resultado do aumento das concentrações intracelulares de cálcio, as vias de sinalização são rapidamente ativadas por processos inflamatórios (141), o influxo de cálcio ativa diversas cascatas de fosforilação, entre elas proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (142). Tem sido mostrado que muitas protéinas intracelulares interagem com α7nAChRs e participam da transdução do sinal. Como resultado da ativação do α7nAChR, o fator de transcrição nuclear NF-kB é ativado por meio da via Janus quinase 2 (JAK-2) (103), fosfatidilinositol quinases PI3K e proteína serina-treonina-quinase AKT (143) e o transdutor de sinal STAT1, STAT3 e STAT5 via JAK-2 / PI3K / AKT (141, 144).

Na realidade o α7nAChR e seus mecanismos de sinalização têm sido extensivamente estudados em neurônios e em diversos modelos de inflamação aguda, mas o conhecimento sobre suas ações em células do sistema imunológico é ínfimo. De modo contrário a ação por neurônio, a transdução do sinal pelo α7nAChR em células imunes não requer a atividade do canal iônico ou despolarização de membrana. Assim alguns autores demonstraram que ao ativar α7nAChR com o agonista nicotínico, GTS21 e/ou colina ocorre a ativação pleiotrópicas de cascatas intracelulares de transdução de sinal em monócitos e macrófagos que regulam negativamente a transdução nuclear do NF-KB e suprimi a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (104, 139, 145, 146).

Em células microgliais, a sinalização α7nAChR inibe a liberação de citocinas inflamatórias por um mecanismo que envolve a diminuição da foslorilação das MAPKs p38 (também conhecido como MAPK14) e p44 (também conhecido como MAPK3) (147).

De maneira esquemática o modo como a sinalização α7nAChR inibe cascatas inflamatórias no sistema colinérgico neuronal e não neuronal permeiam a compreensão das vias intracelulares como: MAPKs, NF-KB, JACK2-STAT3 e SOCS3 (Figura 6).

De modo geral a ativação do α7nAChR em macrófagos, monócitos e outros tipos de células do sistema imunológico podem regular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias por inibir a translocação nuclear do NF-kB e a transcrição de citocinas inflamatórias (110, 139, 145). Assim, de Jonge et al. (2005) (133) ao ativar α7nAChR, *in vivo*, mostraram que o efeito anti-inflamatório do agonista nicotina para α7nAChR se dá pelo recrutamento de JaCK2 a

subunidade α7 e subsequente fosforilação de JACK2, logo após se inicia a cascata anti-inflamatória STAT3. Em concordância com essas constatações um inibidor de JACK2 (AG490), anulou os efeitos anti-inflamatórios do agonista GTS-21 em células monucleares do sangue periférico humano ⁽¹⁴⁸⁾, sugerindo que a P-STAT3 (STAT3 fosforilada) revoga a ação do α7nAChR.

Similarmente, a administração de GTS-21, em célula endotelial, reduziu a fosforilação de STAT3 suprimindo a ativação de células endoteliais mediadas por IL-6 por meio da via JACK2/STAT3, além de diminuir os níveis de tratamento de SOCS3 (supressor da sinalização de citocina e um regulador da atividade inflamatória de IL-6) (149).

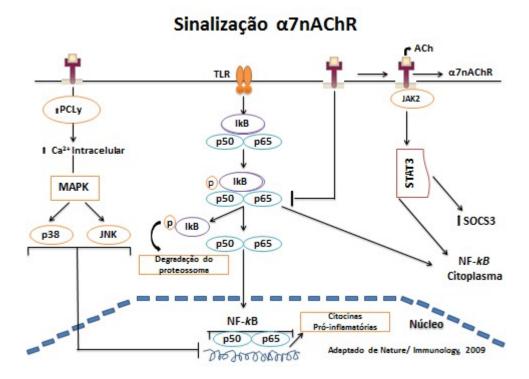


Figura 6 -Vias de sinalização envolvidas na estimulação de α7nAChR. A sinalização α7 regula as repostas inflamatórias por três possibilidades, entre outras. Na primeira possibilidade o α7nAChR regula negativamente a via MAPK, esta em última análise induz a translocação do fator de transcrição NF-KB para o núcleo, uma vez no núcleo o NF-kB é responsável pela liberação de diversas citocinas pró-inflamatória. Em outra via de sinalização na presença de patógenos endógenos ou exógenos ocorre a ativação da fosforilação do IKB e degradação do proteossoma que induz também a translocação do NF-KB o núcleo, contudo ao ativar o α7, ocorre a inibição da fosforização do IKB, fazendo com que o NF-KB permaneça em repouso no citoplasma. Em uma terceira via a sinalização do α7nAChR recruta JACK2 que fosforila STAT3 e estes regulam negativamente a ativação do NF-KB e também pode aumentar a atividade do supressor de citocina 3 (SOCS3) como parte da resposta anti-inflamatória (133)

A função de STAT3 tem sido relatada como divergente por alguns autores e ao que parece a inibição da fosforilação de STAT3 mimetiza a sinalização α7nAChR por inibição do NF-kB e da produção de citocinas em macrófagos. Isto sugere um papel pró-inflamatório para a fosforilação de STAT3. Nesse sentindo, Pena et al. (2010) (150) mostraram que a inibição da expressão de STAT3 aumenta a produção de citocinas e revoga a sinalização

α7nAChR. Esses achados são contraditórios com os encontrados por de Jonge et al. (2005) ⁽¹³³⁾ onde a ação anti-inflamatória da ativação do α7nAChR foi mantida mesmo após a fosforilação de STAT3 em macrófagos peritoneais de modelo de inflamação e íleo pós–operatório ⁽¹³³⁾. Estas respostas aparentemente contraditórias do STAT3 podem ser explicadas pelo menos, em parte, na indução de conjuntos distintos de genes alvo por STAT3 em diferentes células ⁽¹⁵¹⁾.

1.2.2 Sistema colinérgico antiinflamatório e α7nAChR no pulmão

Nosso grupo demonstrou recentemente que a redução da liberação de ACh devido a redução nos níveis do transportador vesicular de acetilcolina (VAChT-KD) induziu inflamação das vias aéreas em animais sem doença pulmonar prévia. Nestes animais houve ativação das vias JAK2/STAT3, NF-kB e SOCS3 (152), sugerindo que o sistema colinérgico anti-inflamatório desempenha um importante papel na manutenção da homeostasia pulmonar. Ainda, animais da linhagem VAChT-KD submetidos a um modelo de sepses induzido por ligadura cecal tiveram redução de células T helper e citotóxica e aumento de células Th17 além de aumento nas citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α, sugerindo que a ACh modula a resposta inflamatória durante a sepses por via de IL-17 (153).

A estimulação do α 7nAChR atenua a inflamação pulmonar e os níveis de TNF- α observada em modelos de lesão aguda (130, 154, 155, 156, 157). Mabley et

al. (2011) $^{(157)}$ ao utilizar o agonista não seletivo (nicotina) do α 7nAChR em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por instilação intratraqueal de lipopossacarídeos (LPS) em camundongos, demonstraram redução das células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA), das quimiocinas pró-inflamatórias (MIP-1 α , MIP-2, e eotaxina) e das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α).

Atualmente muitas pesquisas estão voltadas para explicar quais são os mecanismos envolvidos no controle da inflamação pelo α7nAChR em células do sistema imunológico. Algumas vias principais têm sido implicadas em células do sistema imune com a seguinte sequência de eventos: Excesso de citocinas ativam o arco reflexo da inflamação, estimulam o nervo vago a liberar ACh que interage principalmente com α7nAChR e inibe a translocação do fator de transcrição NF-kB para o núcleo, inibindo assim a sua cascata inflamatória. Outra hipótese é que a ativação do α7nAChR recrute a tirosina quinase (JAK2) e promova a fosforilação e ativação subsequente do STAT3 (do inglês signal transducer and activator of transcription). A via JAK2-STAT3 é coadjuvante para o potencial anti-inflamatório do sistema colinérgico, pois induz a expressão de proteinas anti-inflamatórias com SOCS3 (158).

A maioria das experiências relativas aos efeitos modulatórios da via colinérgica antiiflamatória sobre a inflamação foram testados em modelos de sépsis, uma síndrome de respostas agudas pró-inflamatórias e sistêmicas, caracterizada por invasão de neutrófilos, alveolite e aumento da permeabilidade do endotélio microvascular pulmonar (159), sendo poucos estudos realizados na doença pulmonar crônica.

Na asma, poucos estudos avaliaram o efeito da via colinérgica antiinflamatória e principalmente do receptor α7nAChR. Neste contexto, Mishra et
al. (2010)⁽¹⁶⁰⁾ sugerem que o receptor α7nAChR possa ser um alvo envolvido
na patogênese da asma, uma vez que a administração de nicotina (agonista
não seletivo do α7nAChR) reduz a liberação de leucotrienos em linhagem de
células RBL e este efeito foi bloqueado pelo antagonista metillicaconitine (MLA)
do α7nAChR.

Em outro estudo utilizando tanto antagonista de α7nAChR quanto animais com ausência de α7nAChR, Mauche et al. (2009) (161) mostraram que este receptor é um importante regulador da plasticidade do epitélio das vias respiratórias em humanos controlando a proliferação celular e as vias de diferenciação celular e por este motivo pode estar envolvido na remodelação das vias aéreas e em doenças broncopulmonares. Blanchet et al. (2005) (162), mostraram que o uso do agonista nicotínico não seletivo 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium em modelo experimental de asma, reduziu o influxo total de células inflamatórias e a eosinofilia pulmonar. Em conjunto, estes trabalhos acima descritos sugerem que o receptor nicotínico α7nAChR possa ser um novo alvo no controle da inflamação pulmonar na asma.

Estudos das vias JAK-STAT-SOCS e NF-κB em modelos de asma foram realizados fora do prisma da via colinérgica antiiflamatória e aqueles que eventualmente associaram estes mecanismos ocorreram em outros modelos que não os de asma. Simeone-Penney et al. (2007) (163) demonstraram em modelo murino de asma que a redução condicional de STAT3 no epitélio das vias aéreas diminuiu o recrutamento de eosinófilos para as vias respiratórias, a

acumulação de citocinas de perfil de Th2 e de quimiocinas no pulmão. Curiosamente, Pena et al. (2010) (150) demonstraram que a presença de STAT3 é necessária para o efeito anti-inflamatório do receptor a α7nAChR na inibição da produção de TNF-α em modelo de sepse, entretanto, a inibição de sua fosforilação previniu a inflamação sistêmica e aumentou a sobrevida destes animais, sugerindo um importante papel de STAT3 não fosforilada na fisiopatologia da sepse.

Contrariamente a Pena et al. (2010) (150), de Jonge et al. (2005) (133) observaram que os efeitos anti-inflamatórios da nicotinia requerem a habilidade da fosforilação de STAT3 e que a estimulação vagal reduz a inflamação induzida por cirurgia de manipulação intestinal por ativação de STAT3 em macrófagos e por também induzir aumento de SOCS3, que desempenha um feedback negativo na via JAK/STAT. Por outro lado, a SOCS3 tem sido associado a gravidade da asma e também ao aumento dos níveis de IgE em humanos (164), contudo não encontramos trabalhos que associem SOCS3 a outras vias de sinalização intracelular e ao sistema colinérgico na asma.

As vias de sinalização intracelular colinérgica neuronal e não neuronal continuam sendo pesquisadas; embora alguns destes mecanismos estejam sendo desvendados, seu papel na mediação em macrófagos e outros tipos de célula ainda é enigmático.

1.3 Tratamento com agonista do α7nAChR (PNU-282987)

O PNU 282987 (N-(3R)-1-Azabiciclo(2.2.2)oct-3-yl-4-clorobenzamida) tem sido descrito como agonista específico sintetizado para o α7nAChR ⁽¹⁶⁵⁾ e tem interações insignificantes com outros subtipos de nAChR. Dada a importância do α7nAChR no sistema colinérgico e na regulação da resposta inflamatória, a ativação da sinalização α7nAChR pelo PNU-282987 tem sido utilizado em inúmeras desordens da saúde, dentre elas: Distúrbios do comportamento ⁽¹⁶⁶⁾, no tratamento da dor em doenças inflamatórias do intestino ⁽¹⁶⁷⁾, em modelo de lesão pulmonar aguda onde este tratamento regula negativamente os níveis de TNF-α e MIP-2 nos neutrófilos ⁽¹³⁰⁾ e na prevenção da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica ⁽¹⁶⁸⁾. Todos esses dados sugerem que o α7nAChR é um importante alvo terapêutico em diversas doenças inflamatórias.

Não há consenso, dentro do nosso conhecimento, sobre a meia vida do PNU-282987 em camundongos após o uso de injeção intraperitoneal, contudo achamos improvável que o PNU-282987 permaneça totalmente inativo depois de duas horas, porque ele tem alta afinidade para α7nAChR e seu valor de meia vida in vitro é 0,120 minutos ⁽¹⁶⁹⁾. A fim de determinar se os efeitos da ativação dos receptores nicotínicos são diretamente relacionados aos α7nAChR alguns autores utilizam o antagonista específico metillicaconitine (0 3-metil-2,5-dioxopirrole) (MLA) ^(130, 168). Turek et al. (1995) ⁽¹⁷⁰⁾ relataram que a meia vida do MLA permanence cerca de 20min após o uso de injeção intraperitoneal em camundongos. Apesar do reconhecimento pela comunidade

científica sobre o papel do α7nAChR em modelos de inflamação ^(125, 130, 131), não temos conhecimento de nenhum trabalho com o uso do agonista seletivo PNU282987 em modelo experimental de asma.

1.4 Justificativa para estudo

A via colinérgica anti-inflamatória é um mecanismo neural que em resposta a uma injuria tecidual periférica libera acetilcolina, via nervo vago, e ativa o α7nAChR para debelar cascatas inflamatórias. Isto coloca o nervo vago, a acetilcolina e o α7nAChR no cerne do controle da resposta inflamatória. Além disso, Wang el al. (2003) (139) demonstraram que o α7nAChR é um componente essencial na modulação da resposta inflamatória frente ao dano tecidual.

Desde a descoberta da via colinérgica antiinflamatoria no ano 2000 por Borovikova ⁽¹¹⁰⁾ até os dias atuais, o potencial terapêutico desta via vem sendo testado em formatos que envolvem a estimulação elétrica do nervo vago, desnervação do vago, deficiência e/ou estimulação do α7nAChR em diversos modelos de doenças inflamatórias e debilitantes. Atualmente o potencial terapêutico da via colinérgica antiinflamatória já é reconhecido pela comunidade científica, mas os caminhos pelos quais o α7nAChR corrabora para modular a resposta inflamatória ainda é enigmático e motivo de muitos estudos.

No pulmão, o α7nAChR é expresso em células epiteliais dos brônquios humanos e de camundongos ^(155, 171, 172), nas células do músculo liso das vias

aéreas ⁽¹²³⁾ e em células do sistema imune, tais como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e em células epiteliais alveolares ^(130, 135, 136, 155). Contudo uma parte considerável dos estudos no pulmão foi realizada em modelos de lesão aguda ^(130, 154-156), deixando uma lacuna curiosa em doenças caracterizadas por processos inflamatórios crônicos como a asma.

Considerando que um novo arsenal terapêutico possa surgir em uma doença que apesar dos tratamentos disponíveis apresenta um impacto substancial na qualidade de vida dos indivíduos que a possuem e gera custos a saúde pública em todo o mundo, o estudo dos efeitos da estimulação do α7nAChR na fisiopatologia da asma é de extrema relevância científica.

2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o receptor nicotínico para acetilcolina α7nAChR modula a resposta inflamatória e de remodelamento brônquico em animais com indução alérgica crônica das vias aéreas.

2.2 Objetivo Específico

Avaliar se o tratamento com PNU-282987 após o período de sensibilização interefere com:

- 1. A inflamação de vias aéreas;
- 2. O recrutamento eosinofílico;
- 3. Os níveis de citocinas (IL-4, IL-10, IL-13, IL-17) no pulmão;
- As alterações estruturais e de componentes da matriz extracelular na parede das vias aéreas;
- O número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1 ao redor das vias aéreas;
- A expressão das vias de sinalização intracelular envolvidas na modução da resposta inflamatória: NF-KB, STAT3 e SOCS3.

3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados neste estudo animais da linhagem BALB/c sadios do sexo masculino com 6-8 semanas de idade e pesando em média 25g. Os animais receberam cuidado conforme o "guia de cuidados e uso de animais de laboratório" publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH, 1985) e foram mantidos a uma temperatura controlada de 21-23°C, com livre acesso a água e comida. Todas as experiências descritas neste estudo foram aprovadas pela Comissão de Ética Interna da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil) (número de documento 057/14).

3.2 Grupos experimentais

O protocolo experimental incluiu sete grupos divididos aleatoriamente, sendo:

- Grupo Controle: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com solução salina e que foram tratados com veículo;
- Grupo Controle+PNU0,5: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com solução salina e que foram tratados com PNU na dose de 0,5 mg/Kg;

- Grupo OVA+Ve: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com ovoalbumina e que foram tratados com veículo;
- Grupo OVA+PNU0,5: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com ovoalbumina e que foram tratados com PNU na dose de 0,5mg/Kg;
- Grupo OVA+PNU1,0: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com ovoalbumina e que foram tratados com PNU na dose de 1,0mg/Kg;
- Grupo OVA+PNU2,0: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com ovoalbumina e que foram tratados com PNU na dose de 2,0mg/Kg;
- 7. Grupo OVA+ MLA+PNU0,5: Animais que receberam injeção intraperitoneal e inalações com ovoalbumina e que foram tratados com MLA previamente ao tratamento com PNU na dose de 0,5mg/Kg.

3.3 Indução da inflamação pulmonar alérgica crônica

Os animais foram imunizados com OVA injetada intraperitoneal (i.p.) (50 ug) (GRADE IV, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) na presença de 6 mg de Al(OH)3 como adjuvante (Pepsamar, Sandei-Synthelabo SA, Rio de Janeiro, Brasil) diluído em uma solução de 0,2 mL de solução salina nos dias 0, 7 e 14, como previamente descrito (173, 174) (Figura 7). O desafio com OVA em

aerossol começou uma semana após a terceira imunização, nos dias 22, 24, 26 e 28. Para isso, os animais foram colocados numa caixa acrílica (30 centímetros x 15 centímetros x 20 centímetros) acoplada com um nebulizador de ultrassom (US - 1000; ICEL, São Paulo, Brasil) e expostos a 1% de solução de OVA durante 30 minutos. Os animais do grupo controle receberam o adjuvante (i.p.) e foram expostos a inalação com soro fisiológico.

3.4 Tratamento com PNU-282987 e pré-tratamento com MLA

Animais sensibilizados com OVA receberam diariamente a partir do 22º dia do protocolo experimental PNU-282987, um agonista seletivo do α7nAChR, nas doses de 0,5, 1 e 2 mg/kg (i.p.) (130) até o final do protocolo. As doses escolhidas foram baseadas em trabalhos prévios que testaram o PNU-282987 em doses que variaram de 0.4 a 20mg/Kg (i.p.) (155, 161). A fim de determinar os efeitos terapêuticos dos medicamentos utilizados, todos os tratamentos foram iniciados no dia 22 do protocolo, período este em que os animais já tinham sido devidamente sensibilizados. Nos dias em que havia a inalação com OVA, o PNU-282987 foi administrado 2 horas após a inalação. O tratamento com metillicaconitine (MLA), um antagonista seletivo do α7nAChR, foi administrado em parte dos animais na dose de 1 mg/kg (130, 155) 30 minutos antes do tratamento com PNU-282987, a fim de observar se os

efeitos de PNU-282987 eram dependentes do α7nAChR. Os animais controles foram submetidos ao tratamento com veículo (salina) (Figura 7).



- Injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou 50ug
- Inalação com salina ou OVA 1% (30min);
- → PNU-282987 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg (2h após a inalação) e/ou MLA previamente ao PNU (30 min antes)
- Eutanásia e coleta de material

Figura 7- Protocolo experimental. Os animais receberam uma injeção i.p. de solução salina ou com 50 ug de OVA diluída em 6 mg de Al (OH) 3, nos dias 0, 7 e 14. Depois, os animais receberam inalação de OVA (1%) ou de solução salina nos dias 22, 24, 26 e 28 por 30 minutos. A partir do dia 22 até o fim do protocolo, parte dos animais recebeu tratamento com PNU-282,987 diariamente, um agonista do α7nAChR, 2h após a inalação. A fim de verificar se as respostas obtidas do tratamento com PNU282987 foram dependentes de α7nAChR, parte dos animais foram pré-tratados com MLA, um antagonista de α7nAChR, sendo as doses de MLA aplicadas 30min antes da dose de PNU282987. No dia 29, os animais foram anestesiados e eutanasiados e o material coletado para posterior análise

3.5 Contagens de células no lavado broncoalveolar (LBA) e no sangue periférico

Todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg.kg-1, i.p.), no dia 29 (Figura 7), submetidos à laparotomia e as amostras de sangue foram obtidas a partir da veia cava inferior e diluídas (1:20) em fluido de Turk (1%). Em seguida, os animais foram exanguinados via secção da aorta abdominal. Foi então realizada uma traqueostomia e o LBA foi então obtido pela infusão de 0,5 mL de salina por 3 vezes consecutivas (total volume 1,5mL) (174), pela cânula tragueal, com o uso de uma seringa. Para realizar a contagem total e diferencial de células, o volume recuperado foi centrifugado a 800 rpm, a 5°C, durante 10 min. O sobrenadante do LBA foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior dosagem de citocinas. O número total de células viáveis no sangue periférico e no LBA foi determinada com o auxílio de um hemocitômetro de Neubauer por microscopia óptica (Olympus CH30). O sedimento de células foi ressuspendido em 0,2 mL de solução salina estéril. As contagens de células diferenciais foram realizadas em preparações citocentrifugadas de LBA (450 rpm durante 6 min) (Cytospin, Cheshire, Reino Unido) coradas com Diff-Quick (Biochemical Sciences Inc., Swedesboro, NJ). Pelo menos 100 e 300 células foram contadas de acordo com os critérios morfológicos padrão no sangue periférico e no LBA, respectivamente (152).

3.6 Níveis de citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17 no LBA e IgE no sangue periférico dosados por ELISA

Os níveis de IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17 no sobrenadante do LBA, bem como os níveis de IgE no sangue periférico foram medidos pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits disponíveis comercialmente (para as dosagens no LBA foram utilizados kits de citocinas da Duo-Set da R&D Research and Development, San Diego, CA, EUA e para a dosagem de IgE). O protocolo utilizado foi de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. quantificação foi das proteínas realizada por um espectrofotômetro de placa (Epoch - Bioteck, Vermont, EUA) e pelo programa GEN 5.1.1.1 utilizando um comprimento de onda de 450 nm ⁽¹⁵²⁾. Todos os níveis de citocinas do LBA foram expressos em pg de citocinas/mL do LBA e os níveis de IgE foram expressos em unidade de densidade ótica.

3.7 Estudos morfométricos

Após a coleta do LBA, a parede anterior do tórax foi aberta e os pulmões removidos em monobloco coração-pulmão. O pulmão esquerdo foi então isolado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido. O pulmão direito foi então infundido com 2 mL de formaldeído a 4%. Após o pulmão direito foi então fixado com formaldeído a 4% durante 24h e, em seguida, transferido para etanol a 70%. Após este período, os pulmões foram

transferidos para o aparelho TP1020 da (Leica Wetzlar, Alemanha) onde realizou o processo de clareamento e desidratação do tecido. Após, o tecido foi transferido para o EG1150 (Leica Wetzlar, Alemanha) para a inclusão da parafina e em seguida colocado em uma placa de gelo (EG1150 H Leica Wetzlar, Alemanha) para resfriamento rápido. Cortes com 5 µm de espessura de pulmão embebidos em parafina foram obtidos com o auxílio de um micrótomo (RM 2245 Leica Wetzlar, Alemanha), corados e submetidos à análise histopatológica (175).

3.7.1 Avaliação da área do edema peribrônquico, da musculatura lisa e do epitélio nas vias aéreas

Os cortes histológicos foram corados com H&E para avaliação da área de edema, da musculatura lisa e do epitélio brônquico. Utilizando um microscópio óptico (CH30, Olympus, Japão), a área de edema, músculo liso e epitélio foi quantificada por meio da técnica de contagem de pontos e retas com um auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida. Foi quantificado o comprimento da membrana basal de cada via aérea a fim de evidenciar se havia diferença no tamanho das vias aréas, pelo número de vezes que a membrana basal coincidia com os interceptos. Considerando que não houve diferença entre o comprimento da membrana basal entre os grupos estudados, a área de edema, músculo liso e epitélio interesse foi determinada pela contagem do número de pontos que coincidia com esta

área, no aumento de 400x, sem necessidade de correções ⁽¹⁷⁴⁾. Foram avaliadas 5 vias aéreas selecionadas aleatoriamente por animal de cada grupo e o resultado expresso em área em μm².

3.7.2 Avaliação dos eosinófilos nas vias aéreas

Para a avaliação dos eosinófilos, os cortes de tecido pulmonar foram submetidos à coloração com Luna, específica para grânulos de eosinófilos (174). A análise morfométrica foi realizada conforme descrita no item 3.7.1. utilizando a técnica de contagem de pontos e retas. Para a quantificação dos eosinófilos, o retículo foi colocado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio (Figura 8A). Cinco vias aéreas selecionadas aleatoriamente de cada corte pulmonar foram analisadas em aumento de 1000x. O número de eosinófilos foi determinado pela razão do número de células positivas dentro da área de interesse dividido pelo número de pontos que coincidiam com a área de interesse ao redor da parede da via aérea. Os resultados foram expressos em células por área (10⁴μm²).

3.7.3 Análise do conteúdo de fibras colágenas e elásticas ao redor das vias aéreas

Os cortes histológicos foram corados para detecção de fibras colágenas usando Sirius-Red (Direct Red 80, C.I. 35780, Aldrich, EUA) e para a detecção de fibras elásticas usando Resorsina Fuchisina com o auxílio de um microscópio Leica DM4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), uma câmera digital (Leica DFC420 Leica Microsystems) e um software de análise de imagem Proplus 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, EUA). A deposição de fibras colágenas e elásticas foram medidas na área delimitada entre as membranas basais epiteliais das vias aéreas até adventícia. Cinco vias aéreas com ampliação de 400x foram avaliadas para cada animal. O conteúdo de fibras colágenas e elásticas (Figura 8B) foi expresso como uma percentagem da área positiva pela área total da parede das vias aéreas (175).

Todas as análises morfométricas descritas acima foram realizadas por um pesquisador devidamente treinado que desconhecia a que grupo experimental pertencia o animal.

3.7.4 Avaliação do número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1

A imunohistoquímica para detecção da expressão de MMP-9 e TIMP-1 foi realizada pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase. Os cortes silanizados (3-Aminopropil-tri etoxi-silano-Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram desparafinados e hidratados (Xilol 1, 2 e 3; Etanol Absoluto 1 e 2, Etanol 96% e Etanol 70), seguidos por lavagem das lâminas em água corrente. Após foi realizada a recuperação antigênica pela exposição de 1 minuto a temperatura de 125°C ao vapor de uma panela de pressão (Decloaking Chamber, Bio-core medical, Califórnia, EUA) onde as lâminas estavam imersas em solução tampão (Target Retrieval Solution, DAKO, Califórnia, EUA). Foi então realizado o bloqueio das peroxidases endógena por meio de 7 lavagens de 5 minutos com água oxigenada (H₂O₂) volume 10. Realizou-se então o bloqueio para ligações inespecíficas em solução de caseína (5 min) e a incubação com Anticorpo Primário anti-MMP-9 (1:500, Santa Cruz Biotechonology, Inc., Texas, EUA) e anti-TIMP1 (1:100, Santa Cruz Biotechonology., Texas, EUA) diluído em solução de BSA 5% (bovine serum albumin) e deixado *overnight* em uma câmera úmida em geladeira à 4°C. Após 18 horas da incubação com o anticorpo primário, foram incubadas por 1 hora em estufa à 37° com o anticorpo secundário. A revelação foi realizada com o cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e as lâminas foram então contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) (152). A detecção da expressão de células positivas para MMP-9 e TIMP-1 ocorreu exatamente como descrito na contagem de eosinófilos no item 3.7.2 (Figura 8A).

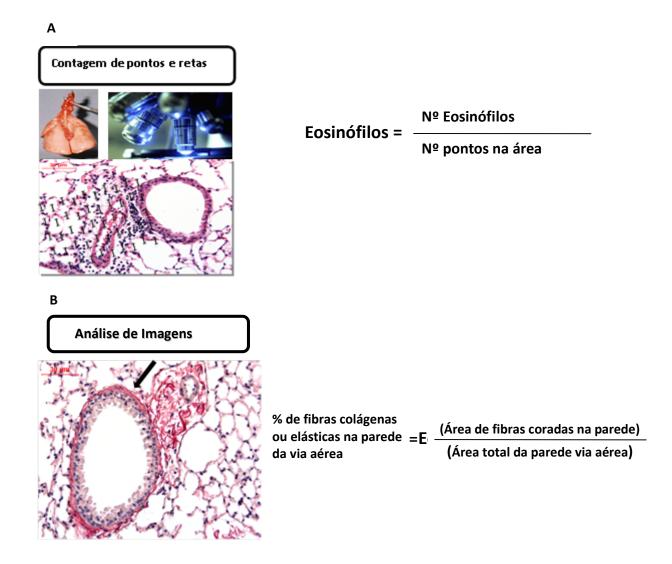


Figura 8 - Análise Morfométrica. A. Posicionamento do retículo na área da parede da via aérea para realização da técnica de contagem de pontos. Foram contados o número de pontos na área de edema, músculo liso, e epitélio brônquico pela técnica de contagem de pontos e retas com o auxílio de um retículo acoplado a ocular do microscópio. Para a contagem de eosinófilos, foi utilizada a coloração de LUNA e quantificados o número de células positivas por área. B. Coloração de Picro-Sírius para detecção de colágeno ao redor da via aérea. O conteúdo de fibras colágenas ou elásticas ao redor das vias aéreas foi determinado pela razão da área de fibras positivas ao redor das vias aéreas pela área total da região de interesse

3.8 Detecção da expressão dos receptores α7nAChR, M3mAChR e do NF-κB total, STAT3 total e fosforilada e SOCS-3 por Western Blot no homogenato pulmonar

O Western blot foi realizado utilizando o protocolo modificado a partir de (176). O pulmão esquerdo congelado foi homogeneizado com o auxílio de um polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35) em 1,5 mL de tampão a 100°C (1% g/mL SDS, 100 mM Trisma (pH 7,5), 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio tetra hidratado, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM ortovanadato de sódio). Após a homogenização, uma fração das amostras foi colocada em um tubo para microcentrífuga e mantida em banho seco por aproximadamente 10 min a 96° C, e subsequentemente mantidas em gelo. Os extratos desses tecidos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C por 40 min para a remoção do material insolúvel. As concentrações de proteína dos sobrenadantes foram determinadas pelo ensaio de Bradford espectrofotometria e uma quantidade igual de proteína total a partir de cada amostra (50 ug) foi tratado com tampão Laemmli contendo ditiotreitol 200 mM e aquecido em banho seco a 96°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE (10% de bis-acrilamida) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos (Thermo Scientific Massachusetts, EUA). Eletrotransferência das proteínas a partir do gel para membrana de nitrocelulose foi realizada durante 90 minutos a 15V (constante) em transferência semi-seca (Transblot SD Semi-dry Transfer Cell,

Bio-Rad). A ligação não específica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi reduzida por incubação da membrana por duas horas em tampão de bloqueio (5% de leite/ Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%). Os anticorpos utilizados para imunotransferência foram: anti-M3 mAChR (receptor muscarínico M3) (1:10000) (Abcam, Cambridge, Massachusetts), anti-α7 nAChR (1:500)(Abcam, Cambridge, Massachusetts), e anti-p65-NF-kB (1:1000) (Cell 6956) (Cells Signaling, Danver, Massachusetts) e anti-β-actina (1:1000) (Cell 13346), anti-STAT-3 (1:1000) (Cell 9139) (Cells Signaling, Danver, Massachusetts), anti-pSTAT-3 (1:1000) (Cell 9131), anti-SOCS-3 (1:1000) (Cell 2923) (Cells Signaling, Danver, Massachusetts) diluído em tampão de bloqueio durante a noite a 4°C. As membranas foram mantidas assim a 4°C overnight e foram novamente lavadas, com solução basal, por 30 min. Os anticorpos ligados foram detectados com conjugado de rábano-peroxidade (conjugado com HRP) anti-IgG. As intensidades das bandas foram quantificadas, usando o programa Imagem Uviband (Uvitec, Cambridge, EUA) e foram normalizados pela constitutiva β- actina, exceto o STAT3 fosforilado que foi normalizado pelo STAT3 total. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software Sigma Stat (SPSS Inc., Califórnia, EUA). A normalidade foi avaliada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov e todos os dados foram expressos como média ± SEM. Foram analisados dados pelo teste paramétrico One-Way-ANOVA seguido pelo método de Student-Newman-Keuls. Para a comparação do grupo Controle com Controle+PNU0,5 foi realizado Test t. O nível de significância foi ajustado para 5%.

4

RESULTADOS

4.1 Expressão proteica do receptor nicotínico α7nAChR e muscarínico M3mAChR no pulmão

Foi avaliado a expressão da proteína do α7nAChR e M3 no homogenato do pulmão dos animais sensibilizados com ovalbumina (Figura 9A e B). Verificou-se que há expressão do α7nAChR e M3mAChR no homogenato de pulmão de animais controle e sensibilizados, e que não houve diferença significativa entre os níveis de expressão destes receptores nos grupos experimentais.

4.2 Curva dose resposta do tratamento com PNU-282987 nas células inflamatórias no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados com ovoalbumina

A fim de determinar a melhor dose do tratamento com PNU em modelo de asma experimental, realizamos uma curva dose resposta com três doses de PNU: 0,5, 1,0 e 2,0mg/Kg. Como determinante na escolha da melhor dose utilizou-se principalmente o parâmetro número de eosinófilos recuperados no LBA, uma vez que estas células são características determinantes em modelos de asma em camundongos. Assim, foram avaliadas o número de células totais do LBA (Figura 10A) e de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos (B a E, respectivamente). Observamos que a sensibilização com OVA aumentou o número de células totais, eosinófilos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos no LBA comparado ao grupo

controle que recebeu salina (P≤0,001). Apenas as doses de PNU 0,5 e 1,0 foram eficazes na redução do número total de células do LBA (P≤0,001) e também do número de eosinófilos (P≤0,001 e P<0,05 para as doses de PNU0,5 e PNU1,0 respectivamente), macrófagos (P<0,05 e P≤0,001 para as doses de PNU0,5 e PNU1,0 respectivamente) e neutrófilos (P<0,01 e P<0,05 para as doses de PNU0,5 e PNU1,0 respectivamente). Ainda, a dose de PNU0,5 reduziu o número de linfócitos no LBA dos animais tratados com PNU (P<0,05). O tratamento com PNU na dose de 2,0 não teve efeito na redução do número de células totais, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos.

Observamos que o tratamento com MLA, um antagonista do receptor nicotínico α7nAChR, administrado previamente ao tratamento com PNU0,5 em animais sensibilizados com OVA, suprimiu os efeitos do tratamento com PNU0,5 na redução das células totais (P≤0,001), eosinófilos (P≤0,001), macrófagos (P<0,05) e neutrófilos (P≤0,001), e o grupo OVA+MLA+PNU0,5 apresentou valores de células no LBA semelhantes aqueles observados no grupo OVA+Ve.

Por fim, avaliamos o efeito do tratamento com PNU0,5 no número de células inflamatórias total e de eosinófilos nos animais controle que receberam salina (4 animais do grupo SAL+Ve e 4 animais do grupo SAL+PNU0,5). O grupo salina tratado com PNU0,5 apresentou número semelhante de células totais (SAL+PNU0,5: 0,75±0,15) e de eosinófilos (SAL+PNU0,5: 0,004±0,002) recuperado no LBA em relação aqueles animais que receberam salina e veículo [Células totais: (SAL+Ve:

 $1,16\pm0,23\times10^4$ /mL, P=0,184) e Eosinófilos: (SAL+Ve: 0,006±0,001 x10 4 /mL, P=0,382).

Considerando que (i) a dose de PNU 0,5 mg/kg foi aquela que apresentou melhor efeito na redução de eosinófilos, (ii) que este efeito anti-inflamatório foi revertido pelo tratamento prévio com MLA, e (iii) esta dose não teve efeito no grupo controle que recebeu salina, optamos por utilizar esta dose para dar continuidade aos experimentos e utilizamos apenas um grupo controle que recebeu salina e foi tratado com veículo (Controle).

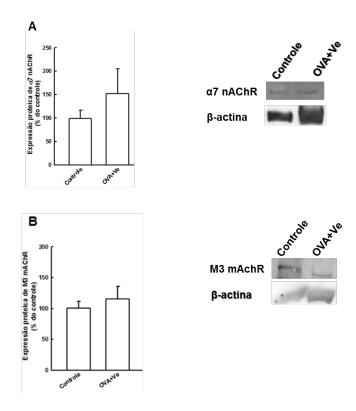


Figura 9 - Expressão proteica de receptores colinérgicos do tipo α7nAChR e M3AChRs no pulmão. A expressão da proteína de receptor nicotínico α7nAChR e muscarínico M3mAChR foi analisada no homogenato do pulmão de animais sensibilizados com OVA e controle que receberam salina no dia 29 do protocolo por Western Blotting. O gel é representativo dos resultados que foram obtidos em uma experiência que foi repetida por três vezes. Os gráficos representam os valores normalizados por β-actina, em média ± erro da porcentagem relativa ao controle (Salina) de 6-7 animais por grupo. Controle: animais que recebram salina e foram tratados com veículo; OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo

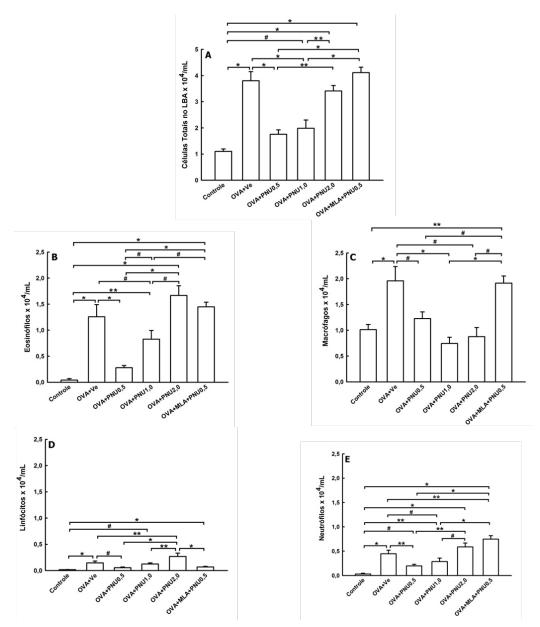


Figura 10 -Curva dose resposta ao tratamento com PNU no número de células totais e diferencial celular recuperados no lavado bronco-alveolar. O número de células totais (A) e o número de eosinófilos (B), macrófagos (C), linfócitos (D) e neutrófilos (E) foram quantificados no LBA de animais sensibilizados com ovoalbumina e controle no dia 29 do protocolo experimental. O tratamento com PNU foi administrado nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg. Ainda foi administrado MLA (dose de 1,0mg/Kg), um antagonista do receptor nicotínico α7nAChR, previamente ao tratamento com PNU a fim de verificar a especificidade do tratamento com PNU. Controle: animais que receberam salina e foram tratados com veículo; OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo; OVA+PNU0,5, OVA+PNU1,0 e OVA+PNU2,0: animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU nas respectivas doses e OVA+MLA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA, e pré-tratados com MLA e posteriormente com PNU na dose de 0,5mg/Kg. Os gráficos representam a média ± erro padrão de 7-12 animais por grupo, exceto o grupo OVA+PNU2,0 que tem um n de 4. *P≤0,001, ** P<0,01 e #P<0,05

4.3 Efeito do tratamento com PNU-282987 no número de eosinófilos no sangue periférico e nas vias aéreas

O aumento dos eosinófilos recrutados para as vias aéreas pode depender do aumento de eosinófilos circulante no sangue periférico. Observou-se um aumento no número de eosinófilos no sangue periférico (Figura 11A) e nas vias áereas (Figura 11 B) nos animais do grupo OVA+Ve em relação ao controle (P≤0,001). O tratamento com PNU0,5 nos animais sensibilizados reduziu o número de eosinófilos no sangue (P≤0,001) e também seu recrutamento para as vias aéreas (P<0,05) em relação aos animais sensibilizados e tratados com veículo (grupo OVA+Ve).

O tratamento com MLA reverteu os efeitos benéficos do tratamento com PNU, sendo que o grupo OVA+MLA+PNU0,5 apresentou número maior de eosinófilos tanto no sangue (P<0,05) quanto nas vias aéreas (P<0,05) em relação ao grupo OVA+PNU0,5. É importante ressaltar que, embora o MLA tenha revertido o efeito do PNU na quantidade de eosinófilos no sangue periférico nos animais sensibilizados, o grupo OVA+MLA+PNU0,5 ainda apresentou valores menores que o grupo OVA+Ve (P<0,01).

Nas figuras C, D e E, podemos observar foto representativa de pulmão corado com LUNA, que identifica eosinófilos, mostrando a presença dos eosinófilos na região peribroncovascular. Nota-se que o representativo do grupo controle (Figura 11C) apresenta poucas células coradas em relação ao representativo do OVA+Ve (11D). O tratamento com PNU0,5 nos

animais sensibilizados reduziu o número de células positivas ao redor da região peribroncovascular (11E).

4.4 Efeito do tratamento com PNU-282987 nos níveis de IgE no sangue periférico

A IgE é uma das principais moléculas associadas a patogênese da asma e está envolvida no recrutamento eosinofílico. Observou-se que os níveis de IgE estavam aumentados no grupo OVA+Ve em relação ao controle (P<0,05, Figura 11F). O tratamento com PNU reduziu os níveis de IgE no grupo OVA+PNU0,5 em relação ao grupo OVA+Ve (P<0,05), e o tratamento prévio com MLA reverteu totalmente os efeitos do PNU (OVA+MLA+PNU0,5 x OVA+PNU0,5, P<0,05).

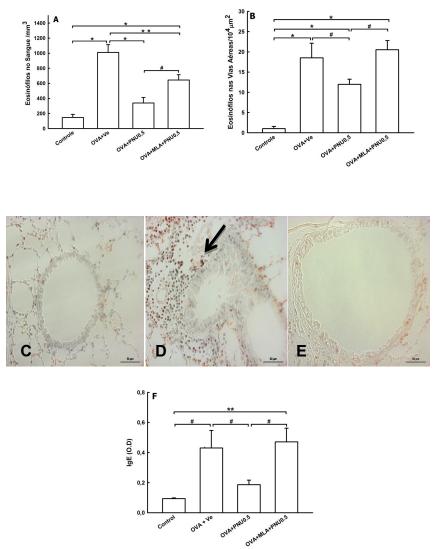


Figura 11 - Eosinófilos no sangue periférico, ao redor das vias aéreas e níveis de anticorpos IgE no sangue. O número de eosinófilos foi quantificado no sangue periférico (A) e, por meio da coloração LUNA, ao redor das vias aéreas e espaço peribroncovascular (B) nos animais sensibilizados com ovoalbumina e controle no dia 29 do protocolo experimental. O tratamento com PNU foi administrado nas doses de 0,5 e o MLA (dose de 1,0mg/Kg), um antagonista do receptor nicotínico α7nAChR, foi administrado previamente ao tratamento com PNU a fim de verificar a especificidade dos tratamentos com PNU. Nos painéis C, D, e E observa-se via aérea representativa de um grupos Controle, OVA+Ve е OVA-PNU0,5, respectivamente. No painel F, está apresentado os níveis de IgE quantificados por ELISA, no sangue periférico. Controle: animais que receberam salina e foram tratados com veículo; OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo; OVA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU na dose de 0,5mg/Kg e OVA+MLA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA, e pré-tratados com MLA e posteriormente com PNU na dose de 0,5mg/Kg. Os gráficos representam a média ± erro padrão de 6-9 animais por grupo. *P≤0,001, ** P<0,01 e #P<0,05.

4.5 Efeito do tratamento com PNU-282987 nos níveis de citocinas IL-4, IL-13, IL-17 e IL-10 no lavado broncoalveolar

As citocinas, particularmente as de perfil Th2, orquestram a resposta inflamatória na asma brônquica. Observou-se aumento dos níveis das citocinas IL-4 (Figura 12A), IL-13 (Figura 12AB) e IL-17 (Figura 12AC) no grupo OVA+Ve em relação ao controle (P<0,05). Os animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU0,5 apresentaram redução nos níveis das respectivas citocinas (P<0,01 para IL-4 e P<0,05 para IL-13 e IL-17). O prétratamento com MLA manteve os níveis das citocinas IL-4 e IL-13 similares aos obtidos no grupo sensibilizado e tratado com veículo (OVA-Ve), sendo maiores em relação ao grupo OVA+PNU0,5 (P<0,05). Curiosamente, o MLA não impediu os efeitos do PNU nos níveis de IL-17. Os níveis de citocina IL-10 (Figura 12D) foram semelhantes em todos os grupos estudados.

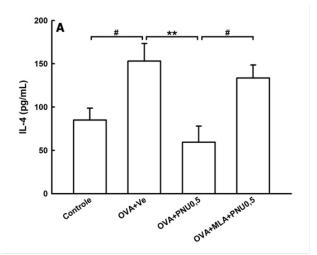
4.6 Efeito do tratamento com PNU-282987 no remodelamento de vias aéreas

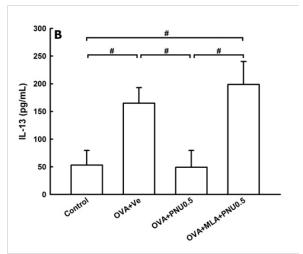
O aumento da deposição das fibras colágenas, o espessamento do músculo liso e também do epitélio brônquico são características do remodelamento de vias aéreas. Não foram observadas diferenças significativas no comprimento da membrana basal das vias aéreas entre os três grupos estudados, sugerindo que as vias aéreas avaliadas foram todas

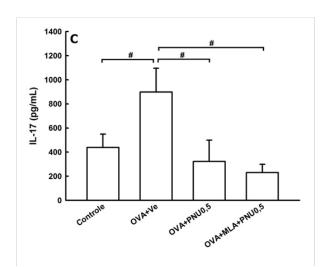
de tamanho equivalente (dados não mostrados). Na Figura 13, avaliamos a área do edema peribrônquico (A), do músculo liso (B) e do epitélio brônquico (C). Os animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo (Grupo OVA+Ve) apresentaram aumento na área de edema peribrônquico (P<0,05), na área da musculatura lisa (P≤0,001), e na área de epitélio brônquico (P<0,05) em relação ao grupo controle. O grupo sensibilizado com OVA e tratado com PNU (OVA+PNU0,5) apresentou redução destas respostas em relação aos animais tratados com veículo (P<0,05 para área de edema e do epitélio brônquico, e P≤0,001 para a área de músculo liso). Observa-se as figuras D, E e F via aérea representativa de um animal do grupo Controle, OVA+Ve e OVA+PNU0,5, respectivamente. Nota-se claramente que a via aérea do animal do grupo OVA+Ve tem epitélio espessado com certo grau de constrição e intensa presença de células inflamatórias na região peribroncovascular associada ao edema.

Ainda avaliou-se a proporção de volume de fibras colágenas (Figura 14A) e elásticas (Figura 14B) depositadas nas vias aéreas. Observou-se que há um aumento do conteúdo de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas do grupo OVA+Ve em relação ao controle (P<0,01 e P≤0,001, respectivamente). O tratamento com PNU suprimiu a deposição de fibras colágenas no grupo OVA+PNU0,5 em relação ao grupo OVA+Ve (P<0,01), sem no entanto afetar o conteúdo de fibras elásticas nestes animais. Considerando que o equilíbrio de metaloproteases e seus inibidores estão bastante relacionados a deposição/degradação de componentes da matriz extracelular, avaliou-se o número de células positivas para a expressão de

MMP-9 e TIMP-1. Nota-se que há um aumento do número de células positivas para MMP-9 (P≤0,001) e TIMP-1 (P<0,01) no grupo OVA+Ve em relação ao grupo Controle. O tratamento com PNU reduziu significativamente estas respostas (P≤0,001 e P<0,05 comparado o grupo OVA+PNU0,5 com OVA+Ve, para MMP-9 e TIMP-1 respectivamente).







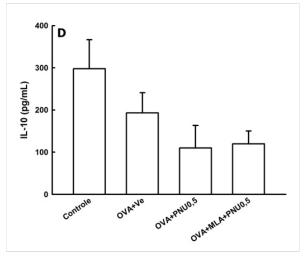


Figura 12 - Níveis de IL-4, IL-13, IL-17 e IL-10 no lavado broncoalveolar dosados por ELISA. Os níveis de IL-4 (A), IL-13 (B), IL-17 (C) e IL-10 (D) no LBA foram quantificados por ELISA nos animais sensibilizados com ovoalbumina e controle no dia 29 do protocolo experimental. O tratamento com PNU foi administrado nas doses de 0,5 e o MLA (dose de 1,0mg/Kg), um antagonista do receptor nicotínico α7nAChR, foi administrado previamente ao tratamento com PNU a fim de verificar a especificidade dos tratamentos com PNU. Controle: Animais que receberam salina e foram tratados com veículo; OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo; OVA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU na dose de 0,5mg/Kg e OVA+MLA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA, e pré-tratados com MLA e posteriormente com PNU na dose de 0,5mg/Kg. Os gráficos representam a média ± erro padrão de 4-7 animais por grupo. *P≤0,001, **P<0,01 e #P<0,05.

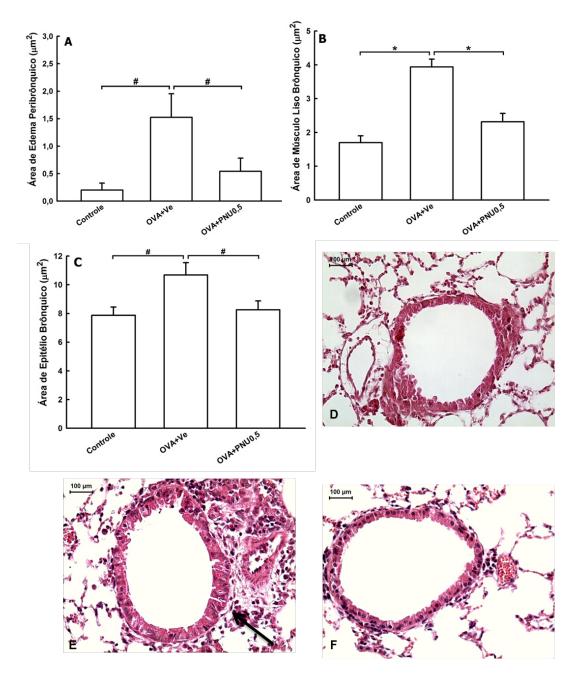


Figura 13 - Avaliação do edema peribrônquico, do músculo liso e do epitélio brônquic por morfometria no tecido pulmonar. As fotomicrografias representativas da área do edema peribrônquico (A), da musculatura lisa (B) e do epitélio brônquico (C) foram quantificadas por morfometria, técnica de contagem de pontos e retas, em pulmão corados com H&E (D a F) retirados de animais sensibilizados com ovoalbumina e controle no dia 29 do protocolo experimental. O tratamento com PNU foi administrado nas doses de 0,5mg/Kg. Controle: Animais que receberam salina e foram tratados com veículo (D); OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo (E); OVA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU na dose de 0,5mg/Kg (F). Os gráficos representam a média ± erro padrão de 6-8 animais por grupo. *P≤0,001, **P<0,01 e #P<0,05

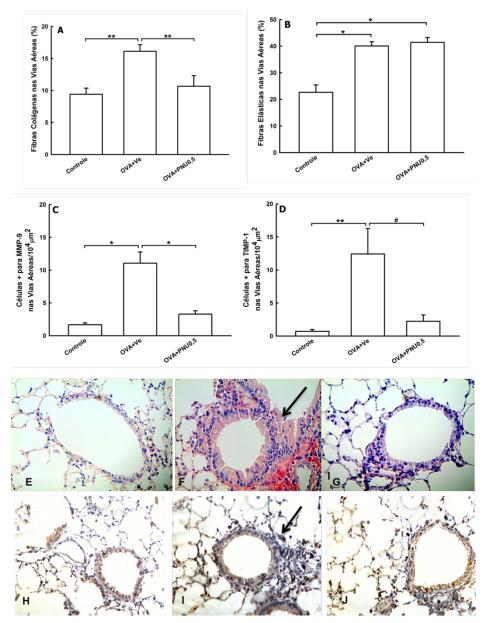


Figura 14 - Avaliação do conteúdo de fibras da matriz extracelular ao redor das vias áereas. As fotomicrografias representativas do conteúdo de fibras colágenas (A) e elásticas (B) foram coradas respectivamente com picro-sirius e resorcina fucsina e foi quantificado ao redor das vias aéreas utilizando um sistema de análise de imagens. Esta análise foi realizada no pulmão de animais sensibilizados com ovoalbumina e controle no dia 29 do protocolo experimental. O tratamento com PNU foi administrado nas doses de 0,5mg/Kg. Controle: animais que receberam salina e foram tratados com veículo; OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo; OVA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU na dose de 0,5mg/Kg. E a G representam pulmão corado para detecção de fibras colágenas de Controle, OVA+Ve e OVA+PNU0,5, respectivamente. H a J representam pulmão corado para MMP-9 de Controle, OVA+Ve e OVA+PNU0,5, respectivamente. Os gráficos representam a média ± erro padrão de 6-8 animais por grupo para fibras colágenas e elásticas e 5-6 para MMP-9 e TIMP-1. *P≤0,001, **P<0,01 e #P<0,05. Setas representam as fibras ou células positivas.

4.7 Efeito do tratamento com PNU-282987 na expressão proteica do NF-κB, STAT3, pSTAT3 e SOCS3.

As vias NF-kB (Figura 15A), STAT3 (Figura 15B e C) e SOCS3 (Figura 15D) estão envolvidas na modulação da resposta inflamatória em diversos modelos incluindo a asma. Observamos que a expressão proteica da subunidade p-65 de NF-kB, a fosforilação de STAT3 e a SOCS3 estão aumentadas no homogenato do pulmão de animais do grupo OVA+Ve em relação ao controle (#P<0,05) e o tratamento com PNU-282,987 reduziu esta resposta (#P<0,05), quando comparado ao grupo OVA+Ve. O tratamento com PNU não apresentou diferença significativa em relação ao controle em nenhum destes parâmetros. Não houve também diferença entre os grupos no conteúdo total de STAT3.

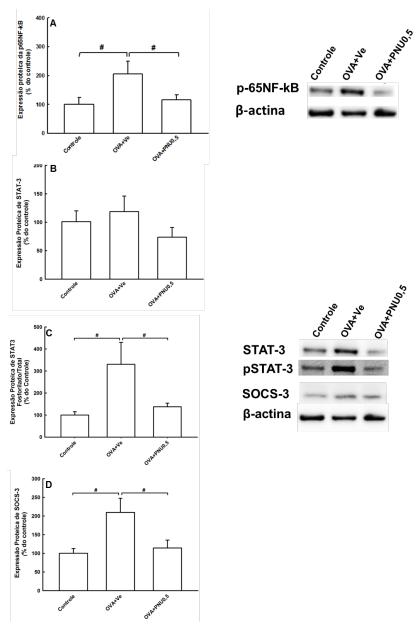


Figura 15 - Avaliação da expressão proteica do P65-NF-kB, dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3 total (STAT3) e fosforilado (pSTAT3) e do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS-3) no homogenato pulmonar. A expressão de p65 de NF-kB (A), STAT3 total (B), STAT3 fosforilada (C) e SOCS-3 (D) foram medidos por Western Blotting em homogenato do pulmão de animais sensibilizados com OVA e controle que receberam salina e foram ou não tratados com PNU0,5mg/kg. O gel é representativo dos média ± erro (5-8animais por grupo) da porcentagem relativa ao controle que foram obtidos em uma experiência que foi repetidas por três vezes e os valores de p65NF-kB, STAT total e SOCS-3 foram normalizados pela β-actina, enquanto STAt3 fosforilada foi normalizada pelo total. Controle: Animais que receberam salina e foram tratados com veículo; OVA+Ve: animais sensibilizados com OVA e tratados com veículo; OVA+PNU0,5: animais sensibilizados com OVA e tratados com PNU na dose de 0,5mg/Kg. (#P<0,05).

5

DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o papel do PNU-282987, um agonista seletivo do α7nAChR, nas alterações pulmonares em modelo de inflamação alérgica crônica das vias aéreas de camundongos. Os nossos resultados mostram que a ativação do α7nAChR pelo PNU-282987 reduz o infiltrado eosinofílico e o remodelamento das vias aéreas, o que foi associado a redução do número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1. Além disso, a estimulação do α7nAChR reduziu consistentemente os níveis de anticorpos IgE e das citocinas de perfil Th2 como IL-4 e IL-13 e citocina IL-17, responsáveis pela patogênese da asma. O efeito antiinflamatório do PNU-282987 neste modelo se deve a redução do fator de transcrição NF-kB e da inibição da ativação do transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT3 e do supressor de citocina 3 (SOCS3).

O modelo de inflamação alérgica crônica pulmonar em camundongos utilizado no presente estudo já foi previamente estudado por nosso grupo de pesquisa (174, 177), e nossos resultados confirmam a eficácia deste modelo, onde os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentam aumento de anticorpos anafiláticos IgE no sangue, a presença de eosinófilos nas vias áereas, no LBA e no sangue periférico, edema peribrônquico com remodelamento brônquico caracterizados por aumento na área de músculo liso e de epitélio associado a deposição de fibras colágenas na parede da via áerea. Desta forma este modelo se torna interessante para elucidação de novos mecanismos

envolvidos na fisiopatologia da asma brônquica e também de novos alvos terapêuticos.

No pulmão, o α7nAChR é expresso em células epiteliais brônquicas humanas e de camundongos ^(155, 171, 172), células do músculo liso das vias aéreas ⁽¹⁷⁸⁾, macrófagos alveolares e células dendríticas ^(155, 179). Além disso, este receptor está expresso em diversas células do sistema imune como linfócitos T e B e eosinófilos ^(135, 136, 179) que podem ser recrutadas para o pulmão frente a um estímulo.

Observamos no presente modelo que há expressão de α7nAChR no pulmão tanto de animais sensibilizados quanto de animais controle. Embora haja certa tendência de aumento dos níveis de α7nAChR em animais sensibilizados com OVA, não houve diferença entre os dois grupos. Poucos trabalhos avaliaram se há modificação na expressão de α7nAChR em modelos de asma ou em pacientes asmáticos. Neste sentido, Chen et al. (2008) (180) mostraram que linfócitos T isolados do sangue de crianças asmáticas apresentam maior expressão de α7nAChR em relação aqueles isolados de crianças sem doença alérgica.

Considerando que a ACh atua no pulmão dependendo do receptor ao qual se liga, podendo desempenhar um papel antiinflamatório ao atuar no receptor nicotínico e pró-inflamatório ao interagir com o receptor muscarínico, avaliamos a expressão do receptor muscarínico do tipo M3, que está bastante associado a uma atividade pró-inflamatória em modelos de doença pulmonar (181, 182). Esta análise teve como objetivo avaliar se neste modelo havia alguma alteração deste receptor induzidos pelo processo de sensibilização.

O tratamento de pacientes asmáticos e DPOC com drogas anticolinérgicas tem sido bastante evidenciado, e o efeito da ACh como broncoconstritor e mediador pro-inflamatório é bastante reconhecido em pacientes asmáticos e DPOC. Ohta et al. (2010) (183) ao administrar um antagonista seletivo para o receptor muscarínico M3, reduziu significativamente a produção de citocinas Th2 em animais sensibilizados com OVA. Em células epiteliais de humanos, Kistemaker et al. (2012) (184) mostraram que o tiotrópium reverte a metaplasia de células produtoras de muco induzida por IL-13.

O uso de agonistas seletivos e não seletivos do α7nAChR tem sido associada a supressão da resposta inflamatória em diversos modelos de inflamação sistêmica ^(126, 140, 156, 157). No pulmão algumas evidências sugerem que a estimulação do α7nAChR também reduz a inflamação ^(130, 154, 155, 157), contudo a maioria dos trabalhos realizados utilizaram modelos de inflamação pulmonar aguda induzido por sepse e pouco se sabe do seu efeito na asma.

O PNU-282987, até onde saibamos, nunca foi utizado em modelos experimentais de asma. Desta forma inicialmente realizamos uma curva dose resposta para o tratamento com PNU, tomando a redução de eosinófilos e células totais como parâmetro de eficácia do tratamento. A dose mais eficaz para a redução da inflamação pulmonar foi a de 0,5 mg/kg, e esta dose não alterou o número de células do LBA dos animais controle expostos a solução salina, sugerindo que a dose é segura.

A administração de PNU em animais sensibilizados reduziu o número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos no LBA. Outro trabalho já havia mostrado em modelo de inflamação aguda o efeito do PNU em neutrófilos e

macrófagos ⁽¹⁵⁵⁾, entretanto não foram avaliados modelos alérgicos onde o eosinófilo é uma das células mais importantes. A biologia do eosinófilo está bem concebida para causar inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade e obstrução ao fluxo aéreo ⁽⁴⁵⁾. Os eosinófilos são identificados como as principais células efetoras da asma, devido aos elevados números de eosinófilos detectados nas vias aéreas e parênquima pulmonar de pacientes asmáticos ^(61, 185) e por sua capacidade de secretar uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13 ⁽¹⁸⁶⁾.

O aumento dos eosinófilos recrutados para o pulmão pode depender do aumento dos eosinófilos circulantes no sangue periférico. A ativação de α7nAChR com PNU-282987 inibiu consistentemente o recrutamento de eosinófilos uma vez que estas células foi reduzida tanto no sangue periférico quanto em vias respiratórias e no LBA. Poucos estudos avaliaram os efeitos da modulação de receptores nicotínicos em modelos de asma. Neste contexto, Mishra et al. (187) mostraram que animais sensibilizados e tratados com nicotina. que é um agonista inespecífico dos receptores nicotínicos, apresentaram uma redução na migração eosinofílica e linfocítica, bem como das citocinas de Th2, quimiocinas, IL-4, IL-5, IL- 13 e IL-25, além da redução de IgE. Blanchet et al. ^(135, 162) também mostraram que um agonista não seletivo de receptores nicotínicos atenuou o infiltrado de eosinófilos no pulmão e os níveis de IgE em modelo experimental de asma e também em eosinófilos isolado de sangue humano. Contudo os trabalhos acima citados utilizaram agonistas nicotínicos não seletivos, que tem pouco potencial terapêutico devido a toxicidade e a outros efeitos indesejados da nicotina. Além disso, os resultados podem ter sofrido a influência de diversos receptores nicotínicos, sem, no entanto esclarecer o papel específico do α7nAChR nestas respostas.

Um estudo recente sugere que a asma alérgica desencadeada por resposta Th2 pode ocorrer mesmo sem a participação do anticorpo IgE ⁽⁴³⁾. Entretanto outros estudos relatam que IgE tem um papel central na indução e manutenção da resposta alérgica ^(40, 188); e de fato é considerada uma revelante molécula associada a patogênese das alergias ⁽¹⁸⁹⁾. Observamos que o PNU reduziu os níveis de IgE nos animais sensibilizados, o que pode explicar o importante efeito observado no recrutamento de eosinófilos. Interessante que o tratamento foi administrado após a segunda semana da sensibilização quando os animais já estão sensibilizados. Estes dados corroboram resultados encontrados por Mishra ⁽¹⁸⁷⁾ e Blanchet ^(135, 162).

As citocinas de perfil Th2 estão na base da imunopatologia da asma alérgica ^(39, 40) e as citocinas IL-4 e IL-13 são responsáveis por estimular a produção de IgE em linfócitos B ^(40, 60) e estão envolvidas no recrutamento de eosinófilos e na persistência da resposta inflamatória ^(45, 62, 190, 191). O tratamento com PNU nos animais sensibilizados reduziu tanto os níveis de IL-4 quanto IL-13 no pulmão.

Embora a asma seja considerada uma doença alérgica de perfil inflamatório clássico Th2, algumas citocinas emergentes, dentre elas, IL-17 vem sendo estudadas para melhor compreensão da fisiopatologia da asma. Apesar dos trabalhos associarem aumento em IL-17 principalmente com asma grave onde há aumento de neutrófilos (72, 73). Wakashin et al. (77) sugerem que Th17 pode colaborar com o aumento da inflamação eosinofílica mediada por

citocinas Th2. Os animais que receberam tratamento com PNU apresentaram níveis menores de IL-17, e embora não se saiba se esta resposta é causa ou consequência dos efeitos do PNU em citocinas Th2, esse é o primeiro relato, no nosso conhecimento, que tenha observado redução da citocina IL-17 por meio da estimulação do α7nAChR em modelo experimental de asma. Corroborando essa ideia, Jeremias et al. (153) observaram que animais com deficiência colinérgica, por redução do VAChT, apresentaram aumento de células Th17 e de citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α após indução da sepse, sugerindo que a via colinérgica antiinflamatória possa ter um efeito mediado por Th17.

Detectamos que o pré-tratamento com MLA, um antagonista de receptor α7nAChR, aboliu os efeitos antiinflamatórios do PNU, onde o grupo OVA+MLA+PNU0,5 apresentou resposta inflamatória semelhante aquela observada no grupo OVA+Ve, demonstrando que os efeitos do PNU são dependentes da ativação de α7nAChR. Surpreendentemente, os efeitos do PNU nos níveis de IL-17 não foram abolidos pelo pré-tratamento com MLA, sugerindo que talvez o PNU possa ter um efeito independente do α7nAChR no controle de citocinas IL-17 ou ainda que esta redução seja um efeito indireto.

A IL-10 é uma citocina regulatória, entretanto sua diminuição ou aumento na asma ainda não é um consenso ^(192, 193). Embora diversos autores tenham avaliado se a via colinérgica antiinflamatória é dependente de IL-10, poucos conseguiram comprovar este efeito ⁽¹⁹⁴⁾. No presente estudo não observamos efeito algum em IL-10, nem da sensibilização com ovoalbumina

nem do estímulo do receptor α 7nAChR, o que corrobora dados anteriores do nosso grupo $^{(152)}$ e de outros $^{(110)}$.

O remodelamento pulmonar é uma característica marcante na patogênese da asma, que envolve diversas alterações estruturais nas vias aéreas, incluindo espessamento da membrana basal e do epitélio, além de alterações da matriz extracelular. Sua relação com a ativação do α7nAChR foi pouco estudada. Neste sentido, Maouche et al. (161) descreveram que α7nAChR controla a plasticidade do epitélio das vias respiratórias humanas por regulação da proliferação e diferenciação das células basais.

Observamos que o tratamento com PNU reduziu a área de edema peribrônquico ao redor das vias aéreas, uma característica importante da resposta inflamatória. Além disso, houve redução da área da camada de músculo liso e também da área do epitélio brônquico induzido pelo tratamento com PNU. Ainda, notamos que o PNU reduziu a deposição de fibras colágenas ao redor das vias aéreas, sem, no entanto afetar o conteúdo das fibras elásticas. Isto está de acordo com os nossos resultados, já que os ciclos repetitivos de inflamação, cicatrização e reparo, que culminam com o processo de remodelamento brônquico, também são provocados por muitas células inflamatórias, estruturais e algumas citocinas, que foram neste estudo atenuadas pelo tratamento com PNU.

Algumas evidências mostram que o eosinófilo desempenha um papel crucial na patogênese do remodelamento brônquico ^(46, 92), bem como as citocinas IL-13, cujo á supressão antes do desafio com o alérgeno (*in vivo*) diminuiu o número de células caliciformes e a deposição de fibras colágenas

(90). A citocina IL-17 também tem sido relacionada ao aumento da produção de proteínas da matriz extracelular e regulação da função do músculo liso (91, 195). Outro mecanismo importante que tem sido associado ao remodelamento é o nível de IgE. Sabe-se que a IL-4 estimula a produção de IgE que por sua vez é mediador do remodelamento brônquico uma vez que tem efeito na síntese de α-actina no músculo liso e no colágeno do tipo 3 (196, 197).

A relação do conteúdo das fibras elásticas na asma ainda é controverso. Embora alguns autores tenham demonstrado sinais de elastólise na camada superficial de biópsias brônquicas de pacientes asmáticos de diversos graus de intensidade (198), outros não conseguiram demonstrar diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de elastina de asmáticos e não asmáticos (199).

As metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMPs), em situações de desequilíbrio contribuem para o dano tecidual e algumas das características do remodelamento observadas na asma ⁽⁸¹⁾. A MMP-9 é ainda produzida por células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos ^(99, 100) e tem relação com citocinas Th2 e também com Th17 ⁽⁹⁹⁾. No presente estudo encontramos aumento dos níveis de MMP-9 e TIMP-1 nos animais sensibilizados, revertidos após o tratamento com PNU. Embora MMP-9 represente um marcador da inflamação e remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma grave ⁽¹⁰¹⁾ e tenha sido encontrada em altas concentrações no plasma e no lavado brônquico, associado a uma resposta diminuída do TIMP-1, em pacientes com exacerbação aguda de asma e mal asmático ^(101, 102), nenhum trabalho foi realizado com ativação específica do

α7nAChR investigando o comportamento das MMP-9 e seus inibidores teciduais TIMP-1 em modelo experimental de asma. Blanchet et al. (2007)⁽¹³⁵⁾ demonstraram que Dimetilfenilpiperazina (agonistas não selectivos de receptores nicotínicos) reduz a função de eosinófilos *in vitro* e a liberação de MMP-9.

Diversos mecanismos têm sido propostos para entender como a ativação do α7nAChR modula a reposta inflamatória em diferentes modelos, e uma hipótese seria por inibição da translocação do fator de transcrição NF-kB (145) e também pela activação da via de JAK2/STAT3 (133). A via JAK2/STAT3 pode também regular negativamente a ligação de NF-κB ao DNA e/ou aumentar a atividade do supressor de citocina 3 (SOCS3), que culmina com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias [para revisão veja (200)]. Nosso grupo demonstrou que a deficiência colinérgica em animais knock down para VAChT aumentou a ativação de NF-kB e reduziu a via JAK-STAT-SOCS e por isso induziu a inflamação pulmonar (152). No entanto, as vias de sinalização intracelulares para ativação do α7nChR em modelo experimental de asma são pouco conhecidas.

A inibição do p-65-NF-kB está envolvida na redução da produção de citocinas (132, 146). Observamos que os animais sensibilizados (OVA+Ve) mostraram um aumento na expressão do NF-kB total no pulmão em comparação com o controle. O tratamento com PNU-282987 reduziu a expressão de p-65-NF-kB. Isto por sua vez pode explicar os mecanismos envolvidos nas respostas antiinflamatórias do tratamento com PNU no grupo OVA sensibilizado. No pulmão, a administração de agonistas α7nAChR

(nicotina, colina e PNU-282987), em modelo animal de lesão pulmonar aguda induzida por àcido, reduziu a diferenciação de neutrófilos e os níveis de citocinas pró-inflamatórias no LBA e impediu a ativação do NF-kB em macrófagos alveolares (155). Ainda corroborando os nossos resultados, outros autores mostraram que a ativação do α7nAChR reduziu a translocação nuclear do NF-kB e, consequentemente, a transcrição de citocinas pró-inflamatórias ^(139, 145). Recentemente, em modelo experimental de asma, Tully et al. (2013)⁽²⁰¹⁾ demonstraram que a ativação do NF-kB ocorre no epitélio das vias aéreas e pode contribuir para a inflamação, hiperresponsividade e remodelamento pulmonar. Em outro estudo similar, Poynter et al. (2004) (202) demonstraram, em animais sensibilizados com OVA, que a ativação do NF-kB nas vias aéreas aumentou a resposta inflamatória representada, neste modelo, pelos aumentos dos níveis de IgE no sangue e das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA. Entretanto este estudo, apesar de similar, difere do anterior por não apresentar resposta na hiperresponsividade das vias aéreas (203). Todos esses trabalhos nos dão suporte para sugerir que os efeitos anti-inflamatórios do PNU podem ter sido também devido a inibição do NF-kB. Embora não tenhamos avaliado a fosforilação de NF-kB, sabe-se que a subunidade p-65 está relacionada a ativação desta via, uma vez que é necessaria para ativar a transcrição gênica de NF-kB junto com c-REL e RERb (203, 204).

Há muito se debate sobre os papeis pró e antiinflamatórios do STAT3 que parecem ser altamente específicos de acordo com a célula estimulada. Essa discrepância nos efeitos de STAT3 pode ser explicada, pelo menos em parte, pela indução de distintos conjuntos de genes alvo por STAT3 em

diferentes células ⁽¹⁵¹⁾. No presente estudo, os animais sensibilizados com OVA apresentaram aumento na fosforilação de STAT3 no pulmão e o tratamento com PNU-282987 inibiu esta ativação. Nossos resultados corroboram os dados apresentados por Peña et al. (2010)⁽¹⁵⁰⁾ onde a inibição da fosforilação de STAT3 por stattic (inibidor da fosforilação de STAT3), conteve a resposta inflamatória e aumentou a sobrevida em modelo experimental de sepses. Estes autores ainda sugeriram que a fosforilação de STAT3 regula a via NF-kB para modular respostas imunes e inatas em resposta infeção. Além disso, Chatterjee et al. (2009) ⁽¹⁴⁹⁾ utilizando linhagem de célula endotelial observaram que ao administrar GTS-21 (agonista seletivo α-7), houve inibição da fosforilação de STAT3 e supressão das alterações mediadas por IL-6 nesta linhagem.

Em modelo experimental de asma, Simeone et al. (2007) (163) demonstraram que o nocaute condicional de STAT3 no epitélio das vias aéreas diminuiu o recrutamento de eosinófilos para as vias respiratórias, a liberação de citocinas Th2 no pulmão em relação aos animais sem modificação genética. Em conjunto, todos esses estudos formenta que neste modelo de asma a redução da fosforilação de STAT3 pelo tratamento com PNU-282987, possa ter regulado negativamente o NF-KB e inibido a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Embora o supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS-3) seja melhor compreendido como regulador negativo da via JAK-STAT (de Jonge et al; 2005)⁽¹³³⁾, o mecanismo bioquímico desta regulação mediada SOCS ainda não está totalmente elucidado. Além disso, vias inibitórias adicionais têm sido

propostas para bloquear a fosforilação de STAT (Murray et al., 2007 (205)). Por outro lado, na asma, Seki et al. (2003)(206) demonstraram que os níveis de IgE, citocinas Th2 e o infiltrado eosinofílico no LBA estavam aumentados em animais com nocautes para SOCS3 em comparação com os selvagens. Estes autores ainda sugerem que a expressão de SOCS3 em células T correlacionase fortemente com a gravidade da asma. Observamos que os animais sensibilizados e tratados com PNU apresentaram uma redução na expressão de SOCS3 em relação ao grupo OVA+Ve e ainda não apresentaram diferença quando comparado ao controle. Assim, estes dados sugerem que apesar de SOCS3 ser considerado um regulador negativo em algumas vias de sinalização (JAK/STAT), neste modelo, a redução da sua expressão de SOCS3 no grupo OVA+PNU0,5, foi associada a redução da inflamação.

É importante destacar, que estes dados diferem do que obtivemos em animais com redução de VAChT, onde a redução da liberação de ACh induziu redução de JAK2, o que não ativou STAT3 e SOCS3 (152). Entretanto cabe aqui considerar que estes animais não tinham nenhuma doença pulmonar e que as vias STAT3 e SOCS3 podem atuar de forma diferente no controle da resposta inflamatória dependendo da fisiopatologia da doença.

Os limites do nosso trabalho precisam ser pontuados. Não avaliamos, neste momento, o efeito da ativação α7nAChR na função pulmonar. Além disso estudos com animais knockout para o α7nAChR poderiam reforçar a participação especifica deste receptor nas alterações obtidas. Por fim, esclarecer os exatos mecanismos intracelulares envolvidos nas respostas obtidas será importante em futuros trabalhos.

6

CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados mostram que o uso de um agonista específico do α7nAChR reduz a inflamação eosinofílica, os níveis de IgE e de citocinas Th2 e IL-17 em modelo murino de asma. Ainda, o PNU-282987 reduziu o remodelamento das vias aéreas neste modelo e contribuiu com o equilibrio de MMP-9 e TIMP-1. Os mecanismos envolvidos nos efeitos antiinflamatórios da ativação do α7nAChR incluem redução do NF-kB, inibição da pSTAT3 e redução na liberação de SOCS3 no pulmão. Coletivamente nossos dados sugerem que o receptor α7nAChR possa ser um novo alvo de interesse terapêutico para o tratamento da asma.

7

REFERÊNCIAS

- 1. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur Respir J. 2008;31(1):143-78.
- 2. Lemanske RF, Jr., Busse WW. 6. Asthma. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(2 Suppl):S502-19.
- 3. McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, Guo F, Sternberg AL, Van Natta ML, et al. Patterns of Growth and Decline in Lung Function in Persistent Childhood Asthma. N Engl J Med. 2016;374(19):1842-52.
- 4. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am J Resp Crit Care Med. 2000;161(5):1720-45.
- 5. Girodet PO, Allard B, Thumerel M, Begueret H, Dupin I, Ousova O, et al. Bronchial smooth muscle remodeling in nonsevere asthma. Am J Resp Crit Care Med. 2016;193(6):627-33.
- 6. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. Nat Immunol. 2010;11(7):577-84.
- 7. Giavina-Bianchi P, Agondi RC, Kalil J. Asthma studies should be phenotype specific. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(4):1261-2.
- 8. Wang W, Li JJ, Foster PS, Hansbro PM, Yang M. Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. Curr Drug Targets. 2010;11(8):957-70.
- 9. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. Clin Immunol. 2003;109(3):250-65.

- 10. Hallstrand TS, Moody MW, Aitken ML, Henderson WR, Jr. Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. J Allergy Clin Immunol. 2005;116(3):586-93.
- 11. Ronmark E, Andersson C, Nystrom L, Forsberg B, Jarvholm B, Lundback B. Obesity increases the risk of incident asthma among adults. Eur Respir J. 2005;25(2):282-8.
- 12. Sly PD, Kusel M, Holt PG. Do early-life viral infections cause asthma? J Allergy Clin Immunol. 2010;125(6):1202-5.
- 13. Robays LJ, Maes T, Joos GF, Vermaelen KY. Between a cough and a wheeze: dendritic cells at the nexus of tobacco smoke-induced allergic airway sensitization. Mucosal Immunol. 2009;2(3):206-19.
- 14. Berry M, Morgan A, Shaw DE, Parker D, Green R, Brightling C, et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. Thorax. 2007;62(12):1043-9.
- 15. Crimi E, Spanevello A, Neri M, Ind PW, Rossi GA, Brusasco V. Dissociation between airway inflammation and airway hyperresponsiveness in allergic asthma. Am J Resp Crit Care Med. 1998;157(1):4-9.
- 16. Rosi E, Ronchi MC, Grazzini M, Duranti R, Scano G. Sputum analysis, bronchial hyperresponsiveness, and airway function in asthma: results of a factor analysis. J Allergy Clin Immunol. 1999;103(2 Pt 1):232-7.
- 17. Woolcock A, Rubinfeld AR, Seale JP, Landau LL, Antic R, Mitchell C, et al. Thoracic society of Australia and New Zealand. Asthma management plan, 1989. Med J Aust. 1989;151(11-12):650-3.

- 18. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. Am J Resp Crit Care Med. 2010;181(4):315-23.
- 19. Kuhlen JL, Jr., Wahlquist AE, Nietert PJ, Bains SN. Identification of asthma phenotypes in a tertiary care medical center. Am J Med Sci. 2014;348(6):480-5.
- 20. Hargreave FE, Nair P. The definition and diagnosis of asthma. Clin Exp Allergy. 2009;39(11):1652-8.
- 21. GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). Disponível em: http:<u>www.ginaasthma.org</u> 2015 [cited 2016].
- 22. Levy ML, Quanjer PH, Booker R, Cooper BG, Holmes S, Small I. Diagnostic spirometry in primary care: Proposed standards for general practice compliant with American Thoracic Society and European Respiratory Society recommendations: a General Practice Airways Group (GPIAG)1 document, in association with the Association for Respiratory Technology & Physiology (ARTP)2 and Education for Health3 1 www.gpiag.org 2 www.artp.org 3 www.educationforhealth.org.uk. Prim Care Respir J. 2009;18(3):130-47.
- 23. Peters SP, Kunselman SJ, Icitovic N, Moore WC, Pascual R, Ameredes BT, et al. Tiotropium bromide step-up therapy for adults with uncontrolled asthma. N Engl J Med. 2010;363(18):1715-26.
- 24. Kerstjens HA, Disse B, Schroder-Babo W, Bantje TA, Gahlemann M, Sigmund R, et al. Tiotropium improves lung function in patients with severe uncontrolled asthma: a randomized controlled trial. J Allergy Clin Immunol. 2011;128(2):308-14.
- 25. Selroos O. Effect of disease duration on dose-response of inhaled budesonide in asthma. Respir Med. 2008;102(7):1065-72.

- 26. Vogelberg C, Moroni-Zentgraf P, Leonaviciute-Klimantaviciene M, Sigmund R, Hamelmann E, Engel M, et al. A randomised dose-ranging study of tiotropium Respimat(R) in children with symptomatic asthma despite inhaled corticosteroids. Respir Res. 2015;16:20.
- 27. Guevara JP, Wolf FM, Grum CM, Clark NM. Effects of educational interventions for self management of asthma in children and adolescents: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2003;326(7402):1308-9.
- 28. Freitas PD, Ferreira PG, da Silva A, Trecco S, Stelmach R, Cukier A, et al. The effects of exercise training in a weight loss lifestyle intervention on asthma control, quality of life and psychosocial symptoms in adult obese asthmatics: protocol of a randomized controlled trial. BMC Pulm Med. 2015;15:124.
- 29. Franca-Pinto A, Mendes FA, de Carvalho-Pinto RM, Agondi RC, Cukier A, Stelmach R, et al. Aerobic training decreases bronchial hyperresponsiveness and systemic inflammation in patients with moderate or severe asthma: a randomised controlled trial. Thorax. 2015;70(8):732-9.
- 30. Scott L, Li M, Thobani S, Nichols B, Morphew T, Kwong KY. Factors affecting ability to achieve asthma control in adult patients with moderate to severe persistent asthma. J Asthma. 2016;53(6):644-9.
- 31. Zar HJ, Levin ME. Challenges in treating pediatric asthma in developing countries. Paediatr Drugs. 2012;14(6):353-9.
- 32. Datasus. 2015. Disponível em: http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php
- 33. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. Lancet. 2006;368(9537):733-43.

- 34. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. Clin Exp Immunol. 2010;160(1):1-9.
- 35. Giavina-Bianchi P, Aun MV, Bisaccioni C, Agondi R, Kalil J. Difficult-to-control asthma management through the use of a specific protocol. Clinics (Sao Paulo). 2010;65(9):905-18.
- 36. WHO. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach.4; 12–36. 03 Dec 2014. http://www.who.int/gard/publications/GARD. 2014.
- 37. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. Eur Respir J. 2007;30(1):134-55.
- 38. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 2005;5(4):271-83.
- 39. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. Nat Rev Immunol. 2010;10(12):838-48.
- 40. Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. J Allergy Clin Immunol. 2012;129(3):635-45.
- 41. Manise M, Bakayoko B, Schleich F, Corhay JL, Louis R. IgE mediated sensitisation to aeroallergens in an asthmatic cohort: relationship with inflammatory phenotypes and disease severity. Int J Clin Pract. 2016;70(7):596-605.
- 42. Harris RR, Carter GW, Bell RL, Moore JL, Brooks DW. Clinical activity of leukotriene inhibitors. Int J Immunopharmacol. 1995;17(2):147-56.

- 43. Agondi RC, Barros MT, Rizzo LV, Kalil J, Giavina-Bianchi P. Allergic asthma in patients with common variable immunodeficiency. Allergy. 2010;65(4):510-5.
- 44. Herxheimer H. The late bronchial reaction in induced asthma. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1952;3(4):323-8.
- 45. Lemanske RF, Jr., Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2 Suppl 2):S95-102.
- 46. Kita H. Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. Int Arch Allergy Immunol. 2013;161 Suppl 2:3-9.
- 47. Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. Clin Exp Allergy. 2008;38(8):1254-63.
- 48. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, O'Neill KR, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. Science. 2004;305(5691):1773-6.
- 49. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med. 2009;360(10):973-84.
- 50. Akuthota P, Wang H, Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2010;10(1):14-9.
- 51. Nakagome K, Matsushita S, Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2012;158 Suppl 1:96-102.

- 52. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. J Immunol (Baltimore, Md : 1950). 1995;154(9):4719-25.
- 53. Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, et al. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. Clin Exp Allergy. 2004;34(1):145-52.
- 54. Raemdonck K, Baker K, Dale N, Dubuis E, Shala F, Belvisi MG, et al. CD4(+) and CD8(+) T cells play a central role in a HDM driven model of allergic asthma. Respir Res. 2016;17:45.
- 55. Suissa S, Ernst P, Benayoun S, Baltzan M, Cai B. Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. N Eng J Med. 2000;343(5):332-6.
- 56. Suissa S, Ernst P, Kezouh A. Regular use of inhaled corticosteroids and the long term prevention of hospitalisation for asthma. Thorax. 2002;57(10):880-4.
- 57. Proskocil BJ, Fryer AD. Beta2-agonist and anticholinergic drugs in the treatment of lung disease. Proc Am Thorac Soc. 2005;2(4):305-10; discussion 11-2.
- 58. Berair R, Pavord ID. Rationale and clinical results of inhibiting interleukin-5 for the treatment of severe asthma. Curr Allergy Asthma Rep. 2013;13(5):469-76.
- 59. Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. Annu Rev Physiol. 2009;71:489-507.

- 60. Mandler R, Finkelman FD, Levine AD, Snapper CM. IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. J Immunol (Baltimore, Md: 1950). 1993;150(2):407-18.
- 61. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. Annu Rev Immunol. 2006;24:147-74.
- 62. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. J Clin Invest. 1999;103(6):779-88.
- 63. Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. J Immunol (Baltimore, Md : 1950). 2001;167(8):4668-75.
- 64. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. Clin Exp Allergy. 1994;24(1):73-80.
- 65. Borish LC, Nelson HS, Lanz MJ, Claussen L, Whitmore JB, Agosti JM, et al. Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. Am J Resp Crit Care Med. 1999;160(6):1816-23.
- 66. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. Nat Immunol. 2011;12(1):21-7.
- 67. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature. 2010;463(7280):540-4.

- 68. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. Nature. 2010;464(7293):1367-70.
- 69. Halim TY, Steer CA, Matha L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, et al. Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. Immunity. 2014;40(3):425-35.
- 70. Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, Lambrecht BN. Cytokine targets in airway inflammation. Curr Opin Pharmacol. 2013;13(3):351-61.
- 71. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. Am J Resp Crit Care Med. 1999;160(5 Pt 1):1532-9.
- 72. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 2003;28(1):42-50.
- 73. Oda N, Canelos PB, Essayan DM, Plunkett BA, Myers AC, Huang SK. Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response. Am J Resp Crit Care Med. 2005;171(1):12-8.
- 74. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. J Allergy Clin Immunol. 2001;108(3):430-8.
- 75. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. 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;111(6):1293-8.

- 76. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. Nat Immunol. 2007;8(12):1390-7.
- 77. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. Am J Resp Crit Care Med. 2008;178(10):1023-32.
- 78. Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H. Role of IL-23-Th17 cell axis in allergic airway inflammation. Int Arch Allergy Immunol. 2009;149 Suppl 1:108-12.
- 79. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. Curr Opin Pharmacol. 2010;10(3):236-45.
- 80. Bai TR, Knight DA. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. Clin Sci (Lond). 2005;108(6):463-77.
- 81. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et al. Airway remodeling in asthma. Chest. 2003;123(3 Suppl):417s-22s.
- 82. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. Allergol Int. 2007;56(4):341-8.
- 83. Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Ueda T, Chin K, Mishima M. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. Am J Resp Crit Care Med. 2003;168(8):983-8.
- 84. Nakano Y, Muller NL, King GG, Niimi A, Kalloger SE, Mishima M, et al. Quantitative assessment of airway remodeling using high-resolution CT. Chest. 2002;122(6 Suppl):271s-5s.

- 85. Little SA, Sproule MW, Cowan MD, Macleod KJ, Robertson M, Love JG, et al. High resolution computed tomographic assessment of airway wall thickness in chronic asthma: reproducibility and relationship with lung function and severity. Thorax. 2002;57(3):247-53.
- 86. Ward C, Johns DP, Bish R, Pais M, Reid DW, Ingram C, et al. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. Am J Resp Crit Care Med. 2001;164(9):1718-21.
- 87. Chu HW, Halliday JL, Martin RJ, Leung DY, Szefler SJ, Wenzel SE. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. Am J Resp Crit Care Med. 1998;158(6):1936-44.
- 88. Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, et al. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. J Allergy Clin Immunol. 1999;103(2 Pt 1):215-22.
- 89. Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Maeda A, Ishizaki K, et al. Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. Am J Resp Crit Care Med. 2006;174(2):142-51.
- 90. Ma Y, Halayko AJ, Basu S, Guan Q, Weiss CR, Ma AG, et al. Sustained suppression of IL-13 by a vaccine attenuates airway inflammation and remodeling in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;48(5):540-9.
- 91. Letuve S, Lajoie-Kadoch S, Audusseau S, Rothenberg ME, Fiset PO, Ludwig MS, et al. IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(3):590-6.
- 92. Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, et al. Inhibition of airway remodeling in IL-5-deficient mice. J Clin Invest. 2004;113(4):551-60.

- 93. Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. J Clin Invest. 2003;112(7):1029-36.
- 94. Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. Eur Respir J. 1996;9(4):808-20.
- 95. Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. Eur Respir J. 1996;9(4):709-15.
- 96. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. Am J Resp Crit Care Med. 2003;167(10):1360-8.
- 97. James AL, Maxwell PS, Pearce-Pinto G, Elliot JG, Carroll NG. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. Am J Resp Crit Care Med. 2002;166(12 Pt 1):1590-5.
- 98. Cohen L, E X, Tarsi J, Ramkumar T, Horiuchi TK, Cochran R, et al. Epithelial cell proliferation contributes to airway remodeling in severe asthma. Am J Resp Crit Care Med. 2007;176(2):138-45.
- 99. Prause O, Bozinovski S, Anderson GP, Linden A. Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. Thorax. 2004;59(4):313-7.
- 100. Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, et al. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003;49(6):875-84.

- 101. Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, Tillie I, Hartmann D, Wallaert B, et al. Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. Am J Resp Crit Care Med. 1999;159(4 Pt 1):1298-307.
- 102. Belleguic C, Corbel M, Germain N, Lena H, Boichot E, Delaval PH, et al. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. Clin Exp Allergy. 2002;32(2):217-23.
- 103. Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R, Marrero MB. Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. Cell Mol Life Sci. 2011;68(6):931-49.
- 104. Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. Biochem Soc Trans. 2006;34(Pt 6):1037-40.
- 105. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2 Suppl 2):S53-72.
- 106. Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? Pharmacol Ther. 2007;115(2):208-22.
- 107. Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. Life Sci. 2007;80(24-25):2325-9.
- 108. Hasko G, Szabo C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. Biochem Pharmacol. 1998;56(9):1079-87.
- 109. Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Harle P, Scholmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. Gut. 2006;55(11):1640-9.

- 110. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature. 2000;405(6785):458-62.
- 111. Richardson JB. Nerve supply to the lungs. Am Rev Respir Dis. 1979;119(5):785-802.
- 112. Gosens R, Roscioni SS, Dekkers BG, Pera T, Schmidt M, Schaafsma D, et al. Pharmacology of airway smooth muscle proliferation. Eur J Pharmacol. 2008;585(2-3):385-97.
- 113. Fryer AD, Jacoby DB. Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. Am J Resp Crit Care Med. 1998;158(5 Pt 3):S154-60.
- 114. Ayala LE, Ahmed T. Is there loss of protective muscarinic receptor mechanism in asthma? Chest. 1989;96(6):1285-91.
- 115. Rogers DF. Motor control of airway goblet cells and glands. Respir Physiol. 2001;125(1-2):129-44.
- 116. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. Neuron. 2012;76(1):116-29.
- 117. Fagerlund MJ, Eriksson LI. Current concepts in neuromuscular transmission. Br J Anaesth. 2009;103(1):108-14.
- 118. Wang DW, Zhou RB, Yao YM. Role of cholinergic anti-inflammatory pathway in regulating host response and its interventional strategy for inflammatory diseases. Chin J Traumatol. 2009;12(6):355-64.
- 119. Johnston GR, Webster NR. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. Br J Anaesth. 2009;102(4):453-62.

- 120. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. J Intern Med. 2009;265(6):663-79.
- 121. Kenney MJ, Ganta CK. Autonomic nervous system and immune system interactions. Compr Physiol. 2014;4(3):1177-200.
- 122. Hansen MK, Daniels S, Goehler LE, Gaykema RP, Maier SF, Watkins LR. Subdiaphragmatic vagotomy does not block intraperitoneal lipopolysaccharide-induced fever. Auton Neurosci. 2000;85(1-3):83-7.
- 123. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. Br J Pharmacol. 2008;154(8):1558-71.
- 124. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. J Exp Med. 2006;203(7):1623-8.
- 125. Boland C, Collet V, Laterre E, Lecuivre C, Wittebole X, Laterre PF. Electrical vagus nerve stimulation and nicotine effects in peritonitis-induced acute lung injury in rats. Inflammation. 2011;34(1):29-35.
- 126. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. Gastroenterology. 2006;130(6):1822-30.
- 127. Li T, Zuo X, Zhou Y, Wang Y, Zhuang H, Zhang L, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors involve inhibition of HMGB1 release and early proinflammatory cytokines function in collagen-induced arthritis. J Clin Immunol. 2010;30(2):213-20.
- 128. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. Nat Med. 2004;10(11):1216-21.

- 129. Hofer S, Eisenbach C, Lukic IK, Schneider L, Bode K, Brueckmann M, et al. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. Crit Care Med. 2008;36(2):404-8.
- 130. Su X, Matthay MA, Malik AB. Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury. J Immunol (Baltimore, Md : 1950). 2010;184(1):401-10.
- 131. Huston JM, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yuan R, Rosas-Ballina M, et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. Crit Care Med. 2007;35(12):2762-8.
- 132. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. Circulation. 2003;107(8):1189-94.
- 133. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. Nat Immunol. 2005;6(8):844-51.
- 134. Leite HR, Oliveira-Lima OC, Pereira Lde M, Oliveira VE, Prado VF, Prado MA, et al. Vesicular acetylcholine transporter knock down-mice are more susceptible to inflammation, c-Fos expression and sickness behavior induced by lipopolysaccharide. Brain Behav Immun. 2016;57:282-92.
- 135. Blanchet MR, Langlois A, Israel-Assayag E, Beaulieu MJ, Ferland C, Laviolette M, et al. Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist. J Leukoc Biol. 2007;81(5):1245-51.

- 136. Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, Moriwaki Y, Misawa H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. Life Sci. 2007;80(24-25):2314-9.
- 137. Sudheer PS, Hall JE, Donev R, Read G, Rowbottom A, Williams PE. Nicotinic acetylcholine receptors on basophils and mast cells. Anaesthesia. 2006;61(12):1170-4.
- 138. de Jonge WJ, Ulloa L. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. Br J Pharmacol. 2007;151(7):915-29.
- 139. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature. 2003;421(6921):384-8.
- 140. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. J Infect Dis. 2005;191(12):2138-48.
- 141. Smedlund K, Tano JY, Margiotta J, Vazquez G. Evidence for operation of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptor-dependent survival pathways in human coronary artery endothelial cells. J Cell Biochem. 2011;112(8):1978-84.
- 142. Schuller HM, Plummer HK, 3rd, Jull BA. Receptor-mediated effects of nicotine and its nitrosated derivative NNK on pulmonary neuroendocrine cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003;270(1):51-8.
- 143. Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, et al. Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. Carcinogenesis. 2005;26(7):1182-95.

- 144. Chernyavsky AI, Arredondo J, Karlsson E, Wessler I, Grando SA. The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration. J Biol Chem. 2005;280(47):39220-8.
- 145. Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, et al. Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I-kappaB phosphorylation and nuclear factor-kappaB transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor alpha7. Clin Exp Immunol. 2006;146(1):116-23.
- 146. Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang LH, et al. Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. Mol Med. 2008;14(9-10):567-74.
- 147. Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, et al. Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. J Neurochem. 2004;89(2):337-43.
- 148. Kox M, van Velzen JF, Pompe JC, Hoedemaekers CW, van der Hoeven JG, Pickkers P. GTS-21 inhibits pro-inflammatory cytokine release independent of the Toll-like receptor stimulated via a transcriptional mechanism involving JAK2 activation. Biochem Pharmacol. 2009;78(7):863-72.
- 149. Chatterjee PK, Al-Abed Y, Sherry B, Metz CN. Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;297(5):C1294-306.
- 150. Pena G, Cai B, Liu J, van der Zanden EP, Deitch EA, de Jonge WJ, et al. Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. Eur J Immunol. 2010;40(9):2580-9.

- 151. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. Oncogene. 2000;19(21):2548-56.
- 152. Pinheiro NM, Miranda CJ, Perini A, Camara NO, Costa SK, Alonso-Vale MI, et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. PLoS One. 2015;10(3):e0120441.
- 153. Jeremias IC, Victorino VJ, Barbeiro HV, Kubo SA, Prado CM, Lima TM, et al. The role of acetylcholine in the inflammatory response in animals surviving sepsis induced by cecal ligation and puncture. Mol Neurobiol. 2015, Dec 5.
- 154. Giebelen IA, van Westerloo DJ, LaRosa GJ, de Vos AF, van der Poll T. Local stimulation of alpha7 cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF-alpha release in the mouse lung. Shock. 2007;28(6):700-3.
- 155. Su X, Lee JW, Matthay ZA, Mednick G, Uchida T, Fang X, et al. Activation of the alpha7 nAChR reduces acid-induced acute lung injury in mice and rats. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;37(2):186-92.
- 156. Kox M, Pompe JC, Peters E, Vaneker M, van der Laak JW, van der Hoeven JG, et al. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 attenuates ventilator-induced tumour necrosis factor-alpha production and lung injury. Br J Anaesth. 2011;107(4):559-66.
- 157. Mabley J, Gordon S, Pacher P. Nicotine exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury. Inflammation. 2011;34(4):231-7.
- 158. Gallowitsch-Puerta M, Tracey KJ. Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor. Ann N Y Acad Sci. 2005;1062:209-19.

- 159. Kaslovsky RA, Parker K, Siflinger-Birnboim A, Malik AB. Increased endothelial permeability after neutrophil activation occurs by a diffusion-dependent mechanism. Microvasc Res. 1995;49(2):227-32.
- 160. Mishra NC, Rir-sima-ah J, Boyd RT, Singh SP, Gundavarapu S, Langley RJ, et al. Nicotine inhibits FcεRI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha7/alpha9/alpha10-nicotinic receptors1. J Immunol. 2010;185(1):588-96.
- 161. Maouche K, Polette M, Jolly T, Medjber K, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, et al. {alpha}7 nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. Am J Pathol. 2009;175(5):1868-82.
- 162. Blanchet MR, Israel-Assayag E, Cormier Y. Modulation of airway inflammation and resistance in mice by a nicotinic receptor agonist. Eur Respir J. 2005;26(1):21-7.
- 163. Simeone-Penney MC, Severgnini M, Tu P, Homer RJ, Mariani TJ, Cohn L, et al. Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma. J Immunol (Baltimore, Md : 1950). 2007;178(10):6191-9.
- 164. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. Nat Immunol. 2003;4(12):1169-76.
- 165. Chan WK, Wong PT, Sheu FS. Frontal cortical alpha7 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in working and reference memory. Neuropharmacology. 2007;52(8):1641-9.
- 166. Vicens P, Ribes D, Torrente M, Domingo JL. Behavioral effects of PNU-282987, an alpha7 nicotinic receptor agonist, in mice. Behav Brain Res. 2011;216(1):341-8.

- 167. Costa R, Motta EM, Manjavachi MN, Cola M, Calixto JB. Activation of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor (alpha7 nAchR) reverses referred mechanical hyperalgesia induced by colonic inflammation in mice. Neuropharmacology. 2012;63(5):798-805.
- 168. Bregeon F, Xeridat F, Andreotti N, Lepidi H, Delpierre S, Roch A, et al. Activation of nicotinic cholinergic receptors prevents ventilator-induced lung injury in rats. PLoS One. 2011;6(8):e22386.
- 169. Wishka DG, Walker DP, Yates KM, Reitz SC, Jia S, Myers JK, et al. Discovery of N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]furo[2,3-c]pyridine-5-carboxamide, an agonist of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor, for the potential treatment of cognitive deficits in schizophrenia: synthesis and structure--activity relationship. J Med Chem. 2006;49(14):4425-36.
- 170. Turek JW, Kang CH, Campbell JE, Arneric SP, Sullivan JP. A sensitive technique for the detection of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist, methyllycaconitine, in rat plasma and brain. J Neurosci Methods. 1995;61(1-2):113-8.
- 171. Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol. 2001;60(6):1201-9.
- 172. Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Irie K, Masuda J, Takano-Ohmuro H, et al. Expression of SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells. J Neurosci Res. 2009;87(12):2740-7.
- 173. Ruiz Schutz VC, Drewiacki T, Nakashima AS, Arantes-Costa FM, Prado CM, Kasahara DI, et al. Oral tolerance attenuates airway inflammation and remodeling in a model of chronic pulmonary allergic inflammation. Respir Physiol Neurobiol. 2009;165(1):13-21.

- 174. Toledo AC, Sakoda CP, Perini A, Pinheiro NM, Magalhaes RM, Grecco S, et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. Br J Pharmacol. 2013;168(7):1736-49.
- 175. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006;35(4):457-65.
- 176. Caperuto LC, Anhe GF, Cambiaghi TD, Akamine EH, do Carmo Buonfiglio D, Cipolla-Neto J, et al. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. Endocrinology. 2008;149(12):6326-35.
- 177. Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, et al. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. Toxicol Pathol. 2008;36(5):680-6.
- 178. Jiang Y, Dai A, Zhou Y, Peng G, Hu G, Li B, et al. Nicotine elevated intracellular Ca(2)(+) in rat airway smooth muscle cells via activating and upregulating alpha7-nicotinic acetylcholine receptor. Cell Physiol Biochem. 2014;33(2):389-401.
- 179. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H, Horiguchi K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on alpha7 nAChRs. Int Immunopharmacol. 2015;29(1):127-34.
- 180. Chen LY, Liu ZG, Li YH, Feng YZ, Wang JR. [Expression of neuronal acetylcholine receptor alpha 7 (nAChRalpha7) in peripheral blood CD(4)(+) T lymphocytes from asthmatic children]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2008;31(11):803-5.

- 181. Kistemaker LE, Oenema TA, Meurs H, Gosens R. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. Life Sci. 2012;91(21-22):1126-33.
- 182. Xu ZP, Yang K, Xu GN, Zhu L, Hou LN, Zhang WH, et al. Role of M3 mAChR in in vivo and in vitro models of LPS-induced inflammatory response. Int Immunopharmacol. 2012;14(3):320-7.
- 183. Ohta S, Oda N, Yokoe T, Tanaka A, Yamamoto Y, Watanabe Y, et al. Effect of tiotropium bromide on airway inflammation and remodelling in a mouse model of asthma. Clin Exp Allergy. 2010;40(8):1266-75.
- 184. Kistemaker LE, Hiemstra PS, Bos IS, Bouwman S, van den Berge M, Hylkema MN, et al. Tiotropium attenuates IL-13-induced goblet cell metaplasia of human airway epithelial cells. Thorax. 2015;70(7):668-76.
- 185. Hogg JC. The pathology of asthma. APMIS. 1997;105(10):735-45.
- 186. Possa SS, Leick EA, Prado CM, Martins MA, Tiberio IF. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. Front Pharmacol. 2013;4:46.
- 187. Mishra NC, Rir-Sima-Ah J, Langley RJ, Singh SP, Pena-Philippides JC, Koga T, et al. Nicotine primarily suppresses lung Th2 but not goblet cell and muscle cell responses to allergens. J Immunol (Baltimore, Md: 1950). 2008;180(11):7655-63.
- 188. van de Pol MA, Lutter R, van Ree R, van der Zee JS. Increase in allergen-specific IgE and ex vivo Th2 responses after a single bronchial challenge with house dust mite in allergic asthmatics. Allergy. 2012;67(1):67-73.
- 189. Kuhn R. Immunoglobulin E blockade in the treatment of asthma. Pharmacotherapy. 2007;27(10):1412-24.

- 190. Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Kunkel SL. Interleukin-4-dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994;10(5):526-32.
- 191. Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R. Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 1995;12(3):254-9.
- 192. Liravi B, Piedrafita D, Nguyen G, Bischof RJ. Dynamics of IL-4 and IL-13 expression in the airways of sheep following allergen challenge. BMC pulmonary medicine. 2015;15:101.
- 193. Kawano H, Kayama H, Nakama T, Hashimoto T, Umemoto E, Takeda K. IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. Int Immunol. 2016; 28(10):489-501.
- 194. Chernyavsky AI, Arredondo J, Skok M, Grando SA. Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. Int Immunopharmacol. 2010;10(3):308-15.
- 195. Lajoie-Kadoch S, Joubert P, Letuve S, Halayko AJ, Martin JG, Soussi-Gounni A, et al. TNF-alpha and IFN-gamma inversely modulate expression of the IL-17E receptor in airway smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006;290(6):L1238-46.
- 196. Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, et al. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. Clin Exp Allergy. 2004;34(3):437-44.
- 197. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. J Allergy Clin Immunol. 2003;112(2):252-62.

- 198. Bousquet J, Lacoste JY, Chanez P, Vic P, Godard P, Michel FB. Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients. Am J Resp Crit Care Med. 1996;153(5):1648-54.
- 199. Godfrey RW, Lorimer S, Majumdar S, Adelroth E, Johnston PW, Rogers AV, et al. Airway and lung elastic fibre is not reduced in asthma nor in asthmatics following corticosteroid treatment. Eur Respir J. 1995;8(6):922-7.
- 200. van Westerloo DJ. The vagal immune reflex: a blessing from above. Wien Med Wochenschr. 2010;160(5-6):112-7.
- 201. Tully JE, Hoffman SM, Lahue KG, Nolin JD, Anathy V, Lundblad LK, et al. Epithelial Nuclear Factor- kappa B orchestrates house dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, and fibrotic remodeling. J Immunol. 2013;191(12):5811-21.
- 202. Poynter ME, Cloots R, van Woerkom T, Butnor KJ, Vacek P, Taatjes DJ, et al. NF-kappa B activation in airways modulates allergic inflammation but not hyperresponsiveness. J Immunol (Baltimore, Md: 1950). 2004;173(11):7003-9.
- 203. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol. 1998;16:225-60.
- 204. Gasparini C, Feldmann M. NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses. Curr Pharm Des. 2012;18(35):5735-45.
- 205. Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. J Immunol. 2007;178(5):2623-9.
- 206. Seki Y, Inoue H, Nagata N, Hayashi K, Fukuyama S, Matsumoto K, et al. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. Nat Med. 2003;9(8):1047-54.