TABATA MARUYAMA DOS SANTOS

**Anti-IL17 associado ou não ao uso do inibidor da Rho-
quinase em camundongos com inflamação pulmonar
alérgica crônica**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes
Calvo Tibério

São Paulo

2018

TABATA MARUYAMA DOS SANTOS

**Anti-IL17 associado ou não ao uso do inibidor da Rho-
quinase em camundongos com inflamação pulmonar
alérgica crônica**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo
Tibério

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Tabata Maruyama dos
Anti-IL17 associado ou não ao uso do inibidor da
Rho-quinase em camundongos com inflamação pulmonar
alérgica crônica / Tabata Maruyama dos Santos. --
São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo
Tibério.

Descritores: 1.Asma 2.Quinases associada a rho
3.Interleucina-17 4.Anticorpos monoclonais
5.Remodelação das vias aéreas 6.Inflamação

USP/FM/DBD-238/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

À minha família e meu esposo que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos, agradecendo a Deus por toda saúde, entendimento, força e foco. Pela oportunidade de participar com saúde e disposição na elaboração deste trabalho.

Agradeço a minha família, meus pais que em todos os momentos me apoiam, é muito bom ter um colo para correr nos momentos pesados, um amor que me dê colo, um abraço, uma palavra. A minha irmã Fernanda por estar sempre por perto mesmo estando fisicamente longe. Minha sogra Iraci pela ajuda e carinho no meu dia a dia. Amo muito vocês.

Ao Pedro meu esposo, o grande amor da minha vida, devo a ele muito do meu esforço, você torna meus dias mais leves me apoiando e me incentivando a pesquisar e crescer profissionalmente sempre mais.

As minhas chefes do serviço do Hospital Sírio Libanês, Claudia, Edy e Clarice, pelo apoio e compreensão. Aos meus colegas de trabalho, que são mais que colegas, Elaine, Hudson e Isadora, vocês tornaram essa jornada divertida e de muito aprendizado. Cassia, Janete e Aline obrigada pelos abraços, pela escuta sempre ativa, pelos conselhos e encorajamento de todos os dias.

Agradeço também as pessoas que me ajudaram no meu aprendizado e jornada, Esmeralda e Sandra obrigada por todas as aulas de imuno, por todo aprendizado e paciência que tiveram comigo. Rosana obrigada por toda ajuda, carinho e pela força que você me dá sempre que preciso de algo. Edna sempre levantando minha autoestima, obrigada pelo carinho sempre. À Dra Clarice, Dra Fernanda Lopes, Dra Carla pelos ensinamentos, à e Dra Bia e suas alunas pela

ajuda nas análises do BALF e por todas as outras orientações. À Dra. Maria Alonso-Vale e Dra. Maysa Mariana pela ajuda nos processos e análise do RT-PCR. Ao Davi, uma pessoa mais que especial, tenho um carinho imenso.

Meus agradecimentos a cada uma das pessoas do meu grupo, Flavia você sem dúvidas é uma pessoa única e especial, não teve um dia em que estive com você e não saiu sorrisos, obrigada pela leveza do seu ser. Luciana, a plenitude em pessoa, tudo parece ser tão fácil quando você toca, obrigada por me ensinar que existe vida além da tese (risos). Silvia, minha companheira de imuno, obrigada pela paciência, pelas noites de estudo, pelos finais de semana de experimento, pelas ajudas, pelos milhos e cafés compartilhados, que estejamos juntas novamente no doutorado, porque esta dupla funciona muito bem. Leandro, amigo que eu ganhei do mestrado, aquele que nunca negou esforços para me ajudar. Presente que a vida me deu, você é sensacional, não tenho palavras para agradecer tudo que fez por mim, muito obrigada por toda troca de conhecimento.

Renato, primeiramente agradeço por ter me apresentado todo este universo, por ter me ensinado a pescar, aprendo todos os dias com você, em seguida agradeço pelo amigo e por ser uma pessoa tão presente em todos os aspectos da minha vida, espero ser orgulho para você.

E por último, e não menos importante, aliás deixo para o final para destaque, a melhor orientadora que uma mestranda pode ter. Você Iolanda é uma mãe mesmo para nós, pois nos guia, nos orienta, puxa nossas orelhas quando precisamos, nos ensina a caminhar sozinhos, nos ensina o quanto é importante o carinho com as pessoas, e o quanto nós podemos ser competentes

e respeitosos. Admiro muito sua competência, seu conhecimento, e agradeço a Deus por ter a oportunidade de aprender com você todos os dias.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Asma brônquica	19
1.2	Fisiopatologia	22
1.3	Citocinas de perfil Th1, Th2, Th3, Th17 e quimiocinas	26
1.4	Remodelamento	32
1.5	Hiperresponsividade pulmonar.....	36
1.6	Rho-quinase e asma	39
1.7	Propriedades das vias aéreas distais e parênquima pulmonar	44
1.8	Estresse oxidativo e asma	45
1.9	Fatores de transcrição.....	53
1.10	Sistema nervoso colinérgico	55
2	JUSTIFICATIVA.....	57
3	OBJETIVO	59
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	Grupos experimentais	61
4.2	Protocolo de sensibilização	62
4.3	Tratamento com o anticorpo monoclonal anti-IL17	63
4.4	Tratamento com o inibidor da Rho-quinase	64
4.5	Avaliação da mecânica pulmonar	64
4.6	Análise do Fluído do Lavado Broncoalveolar	66
4.7	Histologia e imunohistoquímica.....	67
4.8	Análise morfométrica.....	69
4.9	Analizador de imagens.....	70
4.10	Expressão gênica (RT-PCR).....	71

4.11	Análise estatística	73
5	RESULTADOS	75
5.1	Hiperresponsividade à metacolina	76
5.2	Inflamação.....	82
5.3	Remodelamento	111
5.4	Estresse Oxidativo	129
5.5	Vias sinalizadoras	135
5.6	Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória	141
6	DISCUSSÃO.....	143
7	CONCLUSÕES.....	163
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165

Lista de Abreviaturas e Siglas

$\alpha 7nAChR$	Receptor nicotínico $\alpha 7$
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
Ca^{2+}	Cálcio
CLM	Cadeia leve da miosina
FeNO	Fração exalada de óxido nítrico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
HRVA	Hiperresponsividade das vias aéreas
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
i.p	Intraperitoneal
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
NANC	Sistema não-adrenérgico não-colinérgico
NF	Fator nuclear
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OH	Hidroxila
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SF	Soro fisiológico
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	Thelper
TNF	Fator de necrose tumoral
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina

RESUMO

Santos TM. Anti-IL17 associado ou não ao uso do inibidor da Rho-quinase em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Indivíduos com asma possuem infiltração aumentada de células inflamatórias, produção de quimiocinas e hiperresponsividade de vias aéreas. Estes apresentam níveis aumentados de interleucina (IL)-17, importante na regulação da expressão de mediadores inflamatórios e recrutamento de células inflamatórias, outra característica é aumento da atividade da proteína Rho-quinase em suas vias aéreas. A modulação da IL-17 e da proteína Rho-quinase pode ser promissora para o tratamento desta doença. **OBJETIVO:** Estudar os efeitos dos tratamentos realizados com anticorpo neutralizador anti-IL17 e do inibidor da Rho-quinase, associados ou não, em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica. **MÉTODOS:** Foram utilizados 64 camundongos BALB/c, divididos em 8 grupos (8 animais por grupo): SAL (solução salina); OVA (ovoalbumina), SAL-RHOi (salina e inibidor de Rho-quinase), OVA - RHOi (ovoalbumina e inibidor de Rho-quinase), SAL - anti-IL17 (salina e anti-IL17), OVA - anti-IL17 (ovoalbumina e anti-IL17), SAL - RHOi - anti-IL17 (salina, anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase), OVA - RHOi - anti-IL17 (ovoalbumina, anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase). O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve duração de 28 dias. O Anti-IL17A (clone 50104 - 7,5 µg por dose) foi administrado via intraperitoneal e inibidor de Rho-quinase (Y-27632) intranasal (10 mg/kg), 1h antes de cada desafio com ovoalbumina (22, 24, 26 e 28 dias). **RESULTADOS:** Houve um aumento na resistência do sistema respiratório e na elastância, nos marcadores inflamatórios CD4⁺, CD8⁺, ROCK1 e ROCK2, IL-1-β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, TNFα, em vias sinalizadoras NF-kappaB, FOXP-3 e células dendríticas, em marcadores de remodelamento MMP9, MMP12, TIMP1, iNOS, TGF-β, no conteúdo de isoprostano, decorina, biglicano, fibronectina e fibras colágenas e na expressão gênica de VACHT, IL-17 e arginase, no grupo OVA em comparação com o grupo controle. O tratamento dos animais sensibilizados, de forma individualizada ou a associação dos dois, atenuou estas respostas quando comparados ao grupo sensibilizado com ovoalbumina e não tratado (p<0,05). O tratamento do inibidor de Rho-quinase associado ao anti-IL17 gerou potencialização do controle da resposta de hiperresponsividade à metacolina, assim como nas vias aéreas a redução do número de células positivas TNF-α, IL-4, IL-5 e nos septos alveolares o número de células positivas IL-4, IL-5, TGF-β, FOXP3, ROCK1 e ROCK2 (p<0,05). **CONCLUSÃO:** O tratamento com anti-IL17 associado ao inibidor da Rho-quinase modula a hiperresponsividade das vias aéreas, inflamação, e remodelamento e estresse oxidativo em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica.

Descritores: asma; quinases associada a rho; interleucina-17; anticorpos monoclonais, remodelação das vias aéreas, inflamação

SUMMARY

Santos TM. Anti-IL17 with or without the use of the Rho kinase inhibitor in mice with chronic allergic pulmonary inflammation [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo", 2018.

RATIONALE: Individuals with asthma have increased infiltration of inflammatory cells, chemokines production, and airway hyperresponsiveness. Asthmatics have elevated levels of interleukin (IL)-17, which plays an important role in regulating the expression of inflammatory mediators and recruitment of inflammatory cells, these individuals also have increased Rho-kinase protein activity in their airways. The modulation of IL-17 and Rho-kinase protein may be promising for the treatment of this disease. **OBJECTIVE:** To study the effects of anti-IL17 neutralizing antibody and Rho-kinase inhibitor treatments, associated or not, on mice with chronic allergic lung inflammation. **METHODS:** Were used 64 BALB/c mice, divided into eight groups (n=8 in each group): SAL (saline-instilled); OVA (exposed-ovalbumin); SAL-RHOi (saline and Rho-kinase inhibitor), OVA-RHOi (exposed-ovalbumin and Rho-kinase inhibitor); SAL - anti-IL17 (saline and anti-IL17), OVA - anti-IL17 (exposed-ovalbumin and anti-IL17); SAL - RHOi -anti-IL17(saline, Rho-kinase inhibitor and anti-IL17), OVA - RHOi - anti-IL17 (exposed-ovalbumin, anti-IL17 and Rho kinase inhibitor). The protocol for sensitization and induction of pulmonary inflammation by ovalbumin has the duration of 28 days. The Anti-IL17A neutralizing antibody (clone 50104-7.5 µg per dose) was administered via the intraperitoneal, and Rho-kinase inhibitor (Y-27632) intranasal (10 mg/kg), 1h before each ovalbumin challenge (22, 24, 26 and 28 day). **RESULTS:** There was an increase in respiratory system resistance and elastance, in the positive cells evaluated CD4⁺, CD8⁺, ROCK1 and ROCK2, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, TNFα, TGF-β, MMP9, MMP12, TIMP1 and isoprostane, decorin, biglycan, fibronectin, collagen fibers content, signaling pathways NF-kappaB, FOX-P3, dendritic cells and gene expression of VACHT, IL-17 and arginase in the OVA group compared to the control group. Treatment of the sensitized animals with the Rho-kinase inhibitor or with the anti-IL17 or with the combination of the two, attenuated these responses when compared to the ovalbumin-sensitized and untreated group (p<0,05). The treatment of the anti-IL17 associated Rho-kinase inhibitor generated potentiation of the hyper responsiveness response to methacholine, as well as in the airways the reduction of the number of TNF-α, IL-4, IL-5 positive cells and in the alveolar septa the number of IL-4, IL-5, FOXP3, TGF-β, ROCK1 and ROCK2 (p<0.05). **CONCLUSION:** Anti-IL17 treatment associated with the Rho-kinase inhibitor modulates airway hyperresponsiveness, inflammation, remodeling and oxidative stress in animals with chronic allergic pulmonary inflammation.

Descriptors: asthma; rho-associated kinases; interleukin-17; antibodies monoclonal; airway remodeling; inflammation

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma brônquica

A asma é definida como uma doença crônica das vias aéreas caracterizada pela hiperresponsividade brônquica, inflamação pulmonar, resposta de remodelamento das vias aéreas e obstrução das vias aéreas (Park et al., 2013; Meyer et al., 2014). Considerada uma condição heterogênea, a asma inclui episódios agudos que revertem espontaneamente ou com tratamento, inclui também mudanças estruturais que podem estar relacionadas a sintomas persistentes e redução da função pulmonar (Donovan, 2017; Kim et al., 2018).

Atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015). As mulheres são as mais acometidas pela doença: cerca de 3,9 milhões delas afirmaram ter diagnóstico da enfermidade contra 2,4 milhões de homens, ou seja, prevalência de 39% a mais entre o sexo feminino.

Responsável por mais de 100 mil internações no SUS, estima-se que 235 milhões de pessoas no mundo, incluindo crianças, sofrem com a asma. Seu sintoma é caracterizado, principalmente, por dificuldade respiratória, tosse seca, chiado ou ruído no peito e ansiedade (World Health Organization, 2015; Organização Mundial de Saúde - OMS).

Nas últimas décadas, com o corticosteróide inalatório como o principal agente de tratamento para a asma, a mortalidade da asma diminuiu (Wijesinghe *et al.*, 2009). Por outro lado, no último século houve um aumento das doenças alérgicas, tais como asma, provavelmente relacionado à urbanização (Alfvén *et al.*, 2006).

A asma é responsável por altos custos diretos (por exemplo, cuidados hospitalares e medicamentos) e indiretos (por exemplo, perda de trabalho ou dias escolares) e em muitas vezes está associada a diversas comorbidades. Tem sido demonstrado que os custos indiretos de asma representam a maior parte dos custos, além disso, o seu efeito possui grande impacto na produtividade. Uma das razões é que pacientes com asma são relativamente jovens e são considerados livres de comorbidades. Outra razão é que o aumento geral da longevidade levará inevitavelmente a mais sujeitos asmáticos nos ambientes de trabalho (Ehteshami-Afshar *et al.*, 2016).

A maioria dos pacientes apresenta doença leve, mas uma minoria significativa sofre de formas mais graves da doença, apesar de condutas médicas adequadas. O atendimento e os cuidados a estes pacientes, principalmente os graves, estão associados a repercussões psicossociais e econômicas, representando um sério problema na saúde pública mundial (Price *et al.*, 2013; GINA, 2016).

A asma é a doença crônica mais comum da infância e a principal causa de morbidez infantil decorrente de doenças crônicas, medida por faltas escolares, atendimentos em pronto-socorro e hospitalizações. A asma

geralmente começa na primeira infância; em até metade das pessoas com asma, os sintomas começam durante a infância. O início da asma é mais precoce nos homens do que nas mulheres. No entanto, a asma pode desenvolver-se em qualquer fase da vida, incluindo a idade adulta (GINA, 2018).

A asma possui diferentes mecanismos fisiopatogênicos, comportamentos clínicos e respostas ao tratamento por isso é caracterizada por ser uma doença heterogênea. Segundo a revisão da literatura realizada por Bagnasco (2016) o processo de fenotipagem da asma começou há cerca de 10 anos atrás, com o objetivo de identificar grupos homogêneos (quer clínica ou biologicamente) dos pacientes. Atualmente, mais de 100 genes relacionados com a fisiopatogenia da asma foram identificados.

O contato com o antígeno externo ocorre frequentemente pela via aérea, mas o sistema respiratório possui uma série de mecanismos de defesa que limitam o acesso dos antígenos ao sistema imunológico (Davies, 2014; Liu et al., 2014; Loxham e Davies, 2017).

Em sua maioria, a asma é controlada através de medicação prescrita e tomada regularmente, e as diretrizes internacionais ajudam o médico na escolha do tratamento até os sintomas estarem controlados. No entanto, um percentual pequeno de pacientes se mantém sintomático mesmo com o tratamento adequado. Baixa adesão pode ser uma razão para isso. Krishnan et al. (2004) estudando pacientes hospitalizados por exacerbações de asma, demonstraram que a adesão ao tratamento, medida eletronicamente pelo uso dos corticosteróides inalados e orais, caiu para aproximadamente 50%, dentro de 7

dias após a alta hospitalar. A baixa aderência foi correlacionada com o pior controle dos sintomas.

É reconhecido que uma pequena proporção de pacientes possui uma resposta reduzida às medicações, em particular aos corticosteroides (Busse et al., 2000; Nanzer e Menzies-Gow, 2014). Estes pacientes possuem maior mortalidade e suas vidas são marcadas muitas vezes por esta condição, não obstante a quantidade desproporcional de recursos de saúde gastos. Certamente, a adesão ao tratamento e à educação dos pacientes permanecem o objetivo principal, mas o conhecimento cada vez mais detalhado sobre os mecanismos patogênicos e as novas biotecnologias oferecem a oportunidade de melhor tratamento à doença. Sendo assim, é de grande importância as características clínicas que especificam fenótipos distintos de asma, sendo fundamentais para um melhor entendimento da patogênese da doença para um tratamento adequado (Nanzer e Menzies-Gow, 2014).

1.2 Fisiopatologia

A asma envolve um grande número de diferentes tipos de componentes moleculares e celulares interagindo através de vias fisiopatológicas complexas (Singh et al., 2016).

A sensibilização é o processo inicial para o desenvolvimento da asma, na qual as células dendríticas presentes na mucosa brônquica são ativadas. A ativação gera a produção de citocinas que atraem neutrófilos, monócitos e células dendríticas para as vias aéreas, além de transformar células T CD4⁺ em células de perfil Thelper (Th) 2. Quando a célula Th2 é ativada ocorre

diferenciação linfocitária no sentido de uma resposta de perfil de citocinas Th2, além de haver estímulo à produção de anticorpos IgE, contribuindo para a lesão e inflamação observada na asma (Amin, 2016; Kirstein et al., 2016; Foster et al., 2017). A liberação de diversos mediadores inflamatórios como a histamina, espécies reativas de oxigênio desencadearão uma resposta inflamatória, na qual mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos CD4⁺ Th2 estarão contribuindo com o desencadeamento de sinais e sintomas característicos da asma como a hiperresponsividade brônquica, obstrução das vias aéreas, secreção mucosa e vasodilatação (Krystel-Whittemore et al., 2015; Amin, 2016).

As células apresentadoras de antígenos também têm como função induzir tolerância a estes. Os macrófagos podem suprimir as respostas imunológicas pulmonares por modularem a atividade das células dendríticas, processo conhecido como tolerização. Quando não ocorre a tolerização, as células T CD4⁺ desviam para um perfil Th2 (Kuipers e Lambrecht, 2004).

Os macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteases, proteinases, que podem degradar componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (Tillie-Leblond et al., 2005; Barnig et al., 2018).

O acúmulo local de eosinófilos está envolvido na patogênese da asma (Uhm et al., 2012). Estes possuem a capacidade de armazenar citocinas pré formadas, quimiocinas e fatores de crescimento disponíveis para uso imediato, além de manter a função de barreira epitelial, podendo afetar o remodelamento

do tecido e a imunidade adaptativa. Os eosinófilos liberam proteínas granulares e citocinas que medeiam o dano epitelial, liberam superóxido e participam do recrutamento de outras células inflamatórias (Kariyawasam e Robinson, 2006; Shamri et al., 2011). Estudos prévios demonstraram que a diminuição de eosinófilos pode modificar certas proteínas da matriz na membrana basal subepitelial, sugerindo que o eosinófilo pode desempenhar também um papel importante no remodelamento da via aérea (Boulet, 2018).

Além deles, os mastócitos podem produzir citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) α , IL-4, fator de crescimento fibroblástico (FGF), que influencia a proliferação fibroblástica e atua na digestão da matriz extracelular (Tillie-Leblond et al., 2005). Há relação entre a inflamação das vias aéreas, obstrução do muco e gravidade da asma, sugerindo que a degranulação de mastócitos, está relacionada à secreção de muco. O aumento da desgranulação dos mastócitos e o aumento da área das glândulas mucosas contribuem para a secreção de quantidades crescentes de muco nos casos de asma (Cruse e Bradding, 2016; Gao e Jacobson, 2017).

Uma série de fatores que, geralmente são tolerados por indivíduos normais, são capazes de gerar exacerbações dos sintomas asmáticos (GINA, 2016) como, por exemplo, a exposição a alérgenos, vírus, poluentes, emoções, lipossacarídeos. Após a fase de sensibilização, quando houver o próximo contato do indivíduo com o antígeno, a grande maioria dos asmáticos apresentam a resposta inflamatória aguda, também chamada de fase imediata. Ainda nesta fase ocorre a desgranulação de mastócitos, a liberação de histamina e cistenil-leucotrienos, em um período de 2 a 4 horas após o contato com o antígeno, com

posterior contração da musculatura lisa peribrônquica. A partir desse momento, se inicia o recrutamento de linfócitos e eosinófilos, responsáveis pela liberação de outros mediadores que ocasionam alteração e ou lesão da musculatura lisa, aumento de permeabilidade vascular, hiperresponsividade e aumento na produção de muco, o que caracteriza a resposta tardia. Esta ocorre de 6 a 12 horas após o contato com o antígeno (Akbari et al., 2006; Gauvreau et al., 2015).

A resposta tardia envolve também o recrutamento e ativação de eosinófilos, células T CD4⁺, basófilos, neutrófilos e macrófagos (Nabe Hosokawa, et al., 2011; Nabe, Morishita, et al., 2011; Rosenwasser, 2011). Nesta fase ocorre também à deposição de matriz extracelular, aumento da musculatura lisa brônquica, hiperplasia das glândulas produtoras de muco e remodelamento tecidual, contribuindo na lesão tecidual com perda de epitélio e alteração nas propriedades mecânicas das vias aéreas (Manuyakorn, 2014; Rogers et al., 2014; Pałgan e Bartuzi, 2015).

A inflamação das vias aéreas é orquestrada principalmente por células T CD4⁺ através do tipo-2 de citocinas (Larché et al., 2003). No entanto, as células T CD8⁺ também podem se diferenciar em tipo-2, produtoras de citocinas de células semelhantes a células T CD4⁺ e o seu papel na patogênese da asma pode estar envolvido no desenvolvimento e a manutenção da hiperresponsividade de vias aéreas (Miyahara et al., 2004; Schaller et al., 2005). Estudos evidenciam expressão local de citocinas do tipo 2 por células T CD8⁺ em vias aéreas asmáticas (Visekruna et al., 2013). A asma grave está associada à ativação de células T CD8, em um estudo de acompanhamento de curto prazo,

as células T CD8 foram associadas com o declínio da função pulmonar na asma (Van Rensen et al., 2005; Tsitsiou et al., 2012).

Linfócitos CD8⁺ podem produzir fatores citolíticos para eliminar as células infectadas, mas esses fatores também podem danificar o epitélio das vias aéreas, o que, em seguida, expõe as terminações nervosas da submucosa a estímulos nocivos que desencadeiam a asma (Dakhama et al., 2013).

Resumidamente a inflamação é guiada principalmente pela subclasse específica de linfócitos T conhecida como linfócitos Th2, que controlam e perpetuam a inflamação e o remodelamento, por intermédio da secreção de citocinas específicas, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Renauld, 2001).

1.3 Citocinas de perfil Th1, Th2, Th3, Th17 e quimiocinas

As citocinas podem ser produzidas por diversos tipos de células inflamatórias, tais como linfócitos T, eosinófilos, células estruturais, incluindo células endoteliais e fibroblastos (Miotto et al., 2001).

As citocinas estão envolvidas na sinalização célula a célula, crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose. As ações das citocinas são mediadas por intermédio de receptores específicos presentes na superfície das células-alvo (Hamid e Tulic, 2009).

As células T CD4⁺ se diferenciam em múltiplas linhagens de células T efetoras (Robinson et al., 2013). São identificadas mais de 30 citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma. Dentre elas, estão as derivadas de células T, tais como, as chamadas células T helper-1 (Th1), incluindo interleucina (IL)-2,

interferon (IFN)- γ e IL-12; células Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33); Th3 ou citocinas T regulatórias [IL-10 e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β)]; e células Th17 (IL-17) (Hamid e Tulic, 2009; Akdis et al., 2011).

Outra classe de citocinas inclui as citocinas pró-inflamatórias [IL-1 β , IL-6, IL-11 e TNF- α , citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-18), FGF e fator de crescimento epidérmico e citocinas quimiotáticas ou quimiocinas (Hamid e Tulic, 2009).

Muitas destas citocinas apresentam sobreposições de funções, tornando difícil a diferenciação dos papéis individuais na patogênese da asma e das doenças alérgicas (Barnes, 2008). Contudo, podemos classifica-las em: a) linfocinas: secretadas por células T e regulam a resposta imunológica; b) citocinas de predomínio pró-inflamatório: tendem a amplificar e perpetuar o processo inflamatório; c) fatores de crescimento: promovem a sobrevivência de células que resulta em mudanças estruturais nas vias aéreas; d) quimiocinas: são citocinas quimiotáticas para o processo inflamatório; e) citocinas de predomínio anti-inflamatório: tendem a atenuar a resposta inflamatória (Romagnani, 2000).

Algumas citocinas surgem como alvo para tratamento e controle da asma. A IL-13 e IL-4, em parte, dividem o mesmo receptor e vias de sinalização e ambos estão profundamente envolvidos na síntese de imunoglobulina E (IgE), na ativação de eosinófilos, secreção de muco e remodelamento das vias aéreas. Uma das principais funções da IL-4 consiste em promover a diferenciação de

células indiferenciadas T auxiliares (Th0) para células Th2. Também regula a síntese de IgE pelas células B e a expressão de numerosos genes envolvidos na maturação de macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (Bagnasco et al., 2016). A IgE se liga à superfície dos mastócitos, estes contêm proteoglicanos e podem também contribuir com a resposta inflamatória por intermédio da liberação de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IL-4, IL-5, histamina, leucotrienos e prostaglandinas. A IL-4 liberada dos mastócitos serve para perpetuar a produção de IgE e conseqüentemente os eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5, especificamente, recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendele et al., 2004; Buc et al., 2009; Lemanske e Busse, 2010). Está bem estabelecido que a infiltração de eosinófilos relacionada diretamente com a gravidade da asma e hiperresponsividade de vias aéreas (Trivedi e Lloyd, 2007). Estes processos são demonstrados na Figura 1.

Figura 1. Ilustração do processo inflamatório na asma. Múltiplos mecanismos inflamatórios envolvidos na asma, incluindo diferenciação celular de perfil Th2 e Th17. O alérgeno entra em contato com a via aérea, as células dendríticas apresentam este antígeno as células Th0 que se diferenciam na presença de interleucinas em células de perfil Th1, Th2 e

Th17. Ocorre a ativação e liberação de eosinófilos, macrófagos e mastócitos através de interleucinas como IL-4, IL-5 e IL-17. Vias de estresse oxidativo e liberação de mediadores inflamatórios como histamina, cistenil-leucotrieno, prostaglandina e citocinas perpetuam o processo de inflamação e promovem alterações estruturais ocasionando o processo de remodelamento de vias aéreas. Adaptado de Pelaia G. et al, .2015.

A IL-13, é responsável também por regular produção de NO, secreção de quimiocinas e produção de colágeno em células da musculatura lisa, células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (Junttila et al., 2008).

Os interferons desempenham um papel central nas respostas imunitárias do hospedeiro a infecções virais. O epitélio das vias aéreas libera IFN em resposta a vírus como parte da resposta imune inata inicial à infecção. Também induz os genes de IFN e conduzem à produção de proteínas antivirais. Um ambiente de citocinas do tipo 2 suprime respostas de IFN, e respostas de IFN são capazes de suprimir interleucinas, L-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Duerr et al., 2016; Loo e Wark, 2016).

Células Th17 são uma linhagem de células T efectoras de células T CD4⁺ que foram descritas para a produção de elevados níveis de citocinas IL-17 A, IL-22, IL-1 β , IL-6. TGF- β são reguladores críticos da diferenciação celular TH17. Além disso, a IL-23, produzida por células apresentadoras de antígenos, tem papel na regulação celular Th17, proliferação e produção de citocinas. Os fatores de transcrição chaves que dirigem a linhagem de células Th17 incluem STAT3, ROR γ t e ROR α (Robinson et al., 2013).

A diferenciação das células Th17 nos camundongos ocorre quando as células T são ativadas na presença de TGF- β e IL-6 (Newcomb et al., 2012). Estudos têm fornecido evidências que sugerem que a IL-17 exerce importante

função na regulação da expressão de mediadores inflamatórios e recrutamento de células inflamatórias em várias doenças inflamatórias. Sabe-se também que esta interleucina é o principal produto das células Th17 (Park e Lee, 2010; Park et al., 2013).

Segundo Newcomb et al. (2012) a secreção de IL-17A a partir de células CD4⁺ é também regulada negativamente por STAT6. Em outro estudo de Newcomb et al. (2013) a inibição de IL-13 ou STAT6 em pacientes pode aumentar a expressão da proteína IL-17A, número de neutrófilos, e podem não reduzir a produção de muco.

Há seis membros na interleucina 17 (IL-17), incluindo IL-17A (vulgarmente referida como IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também conhecida como IL-25) e IL-17F. Entre todos os membros, a função biológica e regulação de IL-17A e IL-17F são melhor compreendidas. Os genes que codificam IL-17A e IL-17F estão próximos ao mesmo cromossomo em ratos e humanos, resultando em padrões comuns de expressão. Funcionalmente, ambos IL-17A e IL-17F medeiam respostas pró-inflamatórias (Jin e Dong, 2013).

Segundo Robinson et al. (2013) IL-17A e IL-17F induzem a produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases, bem como recrutam, ativam e regulam a migração de neutrófilos. Existem vários receptores de IL-17, incluindo IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, e IL-17RE. IL-17RA é expresso em células hematopoiéticas, osteoblastos, células endoteliais e células epiteliais, entre outros.

A importância das células Th17 foi originalmente descrita em doenças autoimunes inflamatórias. Evidências sugerem que células Th17 e suas citocinas relacionadas também estão envolvidas na fisiopatologia da asma alérgica (Cua et al., 2003; Doe et al., 2010). A expressão de IL-17 é aumentada no pulmão, expectoração, fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) e nos soros de pacientes com asma. Além disto, a gravidade da asma é positivamente correlacionada com os níveis de expressão de IL-17 (Molet et al., 2001; Wang e Wills-Karp, 2011).

A citocina IL-17 promove eosinofilia nas vias aéreas através da indução de quimiocinas e fatores de crescimento (Alcorn et al., 2010). Esta citocina desempenha um papel fundamental na condução de influxo de neutrófilos para as vias aéreas e por este motivo esta envolvida na fibrose e remodelamento das vias aéreas sugerindo que o bloqueio desta via pode ajudar no controle do remodelamento (Chakir et al., 2003; Al-Muhsen et al., 2011).

Entretanto, ainda existem muitas controvérsias relacionadas às funções da IL-17 nos pulmões. Hellings et al. (2003) por exemplo, demonstraram que a IL-17 orchestra o influxo de granulócitos dependente das células T para as vias aéreas inflamadas. Os dados mostraram que a administração de anticorpo monoclonal anti-IL17 reduz fortemente o influxo de neutrófilos para as vias aéreas no modelo de inflamação alérgica crônica. Por outro lado, o uso de anti-IL17 aumenta o influxo de eosinófilos para os pulmões, provavelmente por aumentar a produção de IL-5. Dependendo do contexto, essa citocina seria capaz de exacerbar ou inibir a asma.

Kudo et al. (2012) demonstraram que a IL-17A exerce efeito no músculo liso das vias respiratórias aumentando as respostas contráteis, através da ativação de NF- κ B e subsequente indução da expressão de RhoA e ROCK2, que resulta no aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina.

Newcomb et al. (2012) demonstraram que em células de camundongo e humanas Th17, a adição de IL-13 resultou na fosforilação de STAT6 e atenuou a produção celular de IL-17A e IL-21, bem como reduziram a expressão do fator de transcrição Th17 ROR-GT (RORC2 em seres humanos).

1.4 Remodelamento

Postula-se que o processo inflamatório crônico provoca alterações estruturais irreversíveis causadas tanto pela ativação de células inflamatórias quanto pela falta de reparo adequado à lesão crônica, explicando talvez o porquê de alguns pacientes asmáticos apresentarem perda parcial e irreversível da função respiratória ao longo do tempo. Episódios repetidos de inflamação podem levar ao remodelamento de vias aéreas, contribuindo para a não reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar. A este processo dá-se o nome remodelamento brônquico (Cohn et al., 2004; James, 2005).

Em pacientes com asma grave, persistente, a arquitetura da parede das vias aéreas, passa por mudanças estruturais importantes, muitas vezes permanentes, incluindo o aumento da deposição de fibronectina e colágeno tipo I, III e VII na camada subepitelial e perda do epitélio das vias aéreas (Jeffery, 2001; Roth et al., 2013). Evidências clínicas indicam correlação entre a hiperresponsividade brônquica e as mudanças estruturais com a inflamação das

vias aéreas, levando os pesquisadores a propor que o remodelamento das vias aéreas é uma anormalidade envolvida na fisiopatogenia da asma (Liu et al., 2017).

O processo de remodelamento das vias aéreas é caracterizado por aumento de células caliciformes, de glândulas submucosas, do número de vasos e do número de células do músculo liso. Além disso, ocorre também espessamento da membrana basal com deposição de fibras colágenas e elásticas e alterações subepiteliais da matriz extracelular (Black, 2004; Hirst et al., 2004). Estas são características comuns da asma que contribuem para a obstrução do fluxo de ar, tanto pela invasão luminal e quanto pela hiperresponsividade de via aérea. Além disso, a broncoconstrição parece promover o remodelamento das vias respiratórias. Assim, a inflamação das vias aéreas e broncoconstrição podem participar de um ciclo vicioso que mantém as anormalidades estruturais características da asma (Grainge et al., 2011).

Cada compartimento da via aérea pode estar estruturalmente alterado desde o epitélio até a vascularização. A agressão repetida do epitélio decorrente do recrutamento de células inflamatórias e a indução de apoptose parece ser o evento desencadeante do remodelamento (Mcparland et al., 2003; Vignola et al., 2003; Wang e Wu, 2003). Este processo envolve um grande número de alterações, incluindo aumento da vascularização, vasodilatação e vazamento microvascular da pareded das vias aéreas (Van Den Berge et al., 2001).

A importância biológica de proteoglicanos (PG), principais componentes da matriz extracelular (MEC) do pulmão tem sido estudada, pois além de

controlar as propriedades biofísicas da matrix extracelular, desempenham papéis importantes na regulação de algumas citocinas. Proteoglicanos possuem funções biológicas, como propriedades mecânicas para regulação de fatores de crescimento e funções celulares (Al Jamal, 2001; Lamoureux et al., 2007). Westergren-thorsson et al. (2002) demonstraram que os indivíduos com as vias aéreas mais hiperresponsivas produziram até quatro vezes mais proteoglicanos totais do que indivíduos com vias aéreas menos hiperresponsivas ou normoresponsivas.

Um proteoglicano que desempenha um papel chave no desenvolvimento e na montagem de diversos tecidos é a decorina, diferencialmente alterada na asma e envolvida na estabilidade e na formação de fibras de colágeno (Cavalcante et al, 2005). É um proteoglicano da MEC, que afeta a mecânica das vias aéreas, interdependência das vias aéreas, e do parênquima e proliferação do músculo liso das vias aéreas (Marchica et al., 2011).

Além disso, a deposição de proteoglicano dentro da parede das vias aéreas difere de acordo com a gravidade da doença. A distribuição diferencial dos proteoglicanos podem alterar o grau de estreitamento das vias aéreas (Pini et al., 2007). Estudos em indivíduos asmáticos leves, moderados e graves tem mostrado aumento no lumican, biglicano, em comparação com indivíduos controle (De et al., 2005; Pini *et.al*, 2007).

Envolvida na adesão das células à proteína da MEC, a fibronectina, é importante na regulação e coordenação de tais processos complexos como o crescimento celular, migração, diferenciação e organização da MEC. O aumento

da deposição de fibronectina e de colágeno no espaço subepitelial das vias aéreas é observada em todas as formas de asma e ocorre mais cedo na progressão da doença (Hocking, 2002 e Ge et al., 2015).

O remodelamento anormal da parede das vias aéreas é um processo dinâmico, que envolve a produção da MEC, a sua degradação e estrutura alterada. A este respeito, as metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de proteases que degradam os componentes da MEC, e seus inibidores específicos conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), são ambos importantes neste processo (Vermeer et al., 2009).

As MMPs além de serem capazes de degradar virtualmente todos os componentes da MEC, também participam na inflamação (Smigiel e Parks, 2017). As células inflamatórias, como os eosinófilos, células T e também algumas células estruturais como as células do músculo liso, são capazes de causar mudanças estruturais irreversíveis devido à secreção e produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, que podem ser ativados ou inativados por clivagem proteolítica resultante da atividade das MMP-9 (Mott e Werb, 2004).

Estudos têm descrito um desequilíbrio na expressão de MMP-9 (também conhecida como collagenase de tipo IV, collagenase de tipo V ou gelatinase B) e TIMP-1 (também conhecido como inibidor da collagenase humana) em pacientes com asma, o que reforça a importância desta interação protease/antiprotease na asma (Lose et al., 2005). Sabe-se que TIMP-1 é o principal inibidor de MMP-9 (Vermeer et al., 2009)

MMP-12 também está presente neste processo e regula a inflamação alérgica induzida por IL-13 nas vias aéreas, controlando, assim, o acúmulo de eosinófilos e macrófagos em resposta à exposição do alérgeno (Lanone, 2002). Esta enzima desempenha um papel fundamental para influenciar o remodelamento das vias respiratórias e por degradar uma vasta gama de proteínas da matriz extracelular, incluindo a elastina, colágeno tipo IV, fibronectina e laminina (Fu et al., 2001, Nénan et al., 2005).

1.5 Hiperresponsividade pulmonar

A hiperresponsividade das vias aéreas (HRVA) é uma condição característica da asma e é encontrada em todos os pacientes com esta doença. Entretanto, há variabilidade considerável na intensidade da HRVA nos pacientes com asma, e o nível de HRVA é variável tanto entre os pacientes quando nos próprios indivíduos, sendo que graus mais elevados de hiperresponsividade são normalmente proporcionais à gravidade da asma subjacente; aqueles com doença mais grave das vias aéreas frequentemente apresentam maior grau de HRVA, levando ao aumento da resistência das vias aéreas ao fluxo aéreo (Cockcroft e Davis, 2006; Busse, 2010).

Fatores como mudanças estruturais e inflamatórias da parede das vias aéreas, espessamento brônquico e edema, assim como o aumento da produção de muco e broncoconstrição contribuem para a obstrução do fluxo de ar tipicamente encontrado na asma (Figura 2). Apesar da musculatura lisa das vias aéreas estar principalmente envolvida na hiperresponsividade da via aérea na asma há décadas, outros papéis importantes da musculatura lisa foram

recentemente identificados. Através do relaxamento das vias aéreas e mediação de mudanças estruturais e da sinalização inflamatória, as células da musculatura lisa da via aérea desempenham múltiplos papéis na fisiopatologia da asma. (Doeing e Solway, 2013).

Figura 2. Ilustração da obstrução das vias aéreas. Múltiplos mecanismos de obstrução do fluxo aéreo na asma, incluindo broncoconstrição do músculo das vias aéreas, obstrução do fluxo de ar pelo muco intraluminal, inflamação e remodelamento da parede das vias aéreas. Imagem adaptada de Doeing e Solway, 2013.

A contração do músculo liso induzida por agonistas é uma das características da asma, contribuindo para a resistência ao fluxo aéreo. O tônus da musculatura lisa é primariamente regulado pelo nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) por mecanismos dependentes e independentes de cálcio (Ca^{2+}) (Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010).

Um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , decorrente da ativação dos canais de cálcio na membrana plasmática e/ou liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, leva à formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, resultando na ativação da miosinoquinase. Esta enzima fosforila a CLM, resultando em contração da musculatura lisa por ligação entre a actina e a

miosina (Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010). Como os filamentos de actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e membrana plasmática por estruturas conhecidas como corpos densos e placas densas, o miócito se contrai (Sylvester, 2004).

A extensão da contração é determinada pelo equilíbrio da atividade entre a miosinoquinase e a miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006). Esta sequência de eventos prediz que o tônus da musculatura lisa deveria ser proporcional à concentração de Ca^{2+} citosólico. Entretanto, na presença de uma concentração fixa de Ca^{2+} , agonistas broncoconstritores também podem elevar a fosforilação da CLM. Além disso, a inibição da miosinofosfatase, que efetivamente aumenta a fosforilação da CLM, pode levar a uma concentração fixa de cálcio citoplasmático. Ou seja, às vezes o nível de Ca^{2+} nem sempre corresponde ao grau de fosforilação da cadeia leve da miosina e de contração do músculo liso, sendo que o nível de contração é maior do que seria esperado para um dado nível de Ca^{2+} . Os mecanismos independentes de Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e contração do músculo liso são conhecidos como sensibilização do Ca^{2+} (Chiba e Misawa, 2004; Sylvester, 2004). Os mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que uma das principais vias envolvidas neste processo é a via RhoA/Rho quinase (Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010).

Várias citocinas envolvidas em muitos casos de asma, tais como a interleucina IL-13 e TNF- α também alteram as propriedades de musculatura lisa de via aérea, através de efeitos sobre a sinalização de cálcio. IL-13 evoca um sinal de cálcio nas células da musculatura e provoca a sua contração. O efeito

das células T sobre a contratilidade também tem sido associada a produção autócrina de IL-5 e IL-1 β (Lauzon e Martin, 2016).

1.6 Rho-quinase e asma

Uma pequena GTPase, Rho, e a sua molécula alvo, a Rho-quinase (ROCK), desempenham um papel importante em funções celulares, incluindo contratilidade, quimiotaxia, adesão e migração, e facilita a infiltração de células inflamatórias tanto *in vitro* e *in vivo* (Fukata et al., 2001; Henry et al., 2005; Taki et al., 2007).

ROCKs também podem estar envolvidas em diversas atividades celulares, como na organização do citoesqueleto, proliferação e apoptose, remodelamento da matriz extracelular e a contração da musculatura lisa. Dependendo da sua localização sub-celular, ativação, e outros fatores ambientais, ROCKs pode ter diferentes efeitos sobre a função celular (Hartmann, Ridley e Lutz, 2015).

A Rho-quinase é uma proteína que exerce funções biológicas, incluindo migração, fagocitose, proliferação, secreção e manutenção da forma celular. Esta proteína parece estar envolvida em uma ampla variedade de doenças associadas ao aumento de tônus da musculatura lisa ou com hiperreatividade do músculo liso (Wettschureck e Offermanns, 2002). Um dos principais inibidores da Rho-quinase é o Y-27632 (Mong e Wang, 2009).

A contração do músculo liso das vias aéreas é mediada por interações entre a actina e miosina que dependem da fosforilação da cadeia leve da miosina

pela serina-treonina quinase. Este processo é regulado negativamente pela miosina fosfatase. A RhoA / Rho-quinase desempenha um papel importante na regulação da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (Erle e Sheppard, 2014), conforme demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Atividade da Rho-kinase na musculatura lisa. Ativação da Rho-quinase via ligação GTP-RhoA, inibindo a fosfatase perpetuando a contração da musculatura lisa. Figura adaptada Chiba Y. e Misawa M., 2004.

A fosfatase da cadeia leve da miosina remove o fosfato da cadeia leve da miosina fosforilada para induzir o relaxamento do músculo liso. A subunidade de ligação à miosina, quando fosforilada, inibe a atividade enzimática da fosfatase da cadeia leve da miosina, permitindo que a miosina da cadeia leve permaneça fosforilada, promovendo assim a contração. A Rho-quinase, fosforila a subunidade de ligação da miosina da fosfatase da cadeia leve da miosina, resultando numa inibição da sua atividade e promovendo assim o estado de fosforilação, contribuindo para um nível aumentado de contração (Schaafsma et

al., 2004; Chiba et al., 2010). Os inibidores farmacológicos da Rho-quinase, tais como Y-27632 e fasudil, bloqueiam a sua atividade e impedem a inibição da fosfatase da miosina ligada à RhoA, resultando no relaxamento do músculo liso (Chiba; Matsusue; Misawa, 2010).

As duas formas de expressão da Rho-quinase, chamadas de ROCK1 e ROCK2, inibem a atividade da miofosfatase e promovem a atividade da mioquinase, aumentando a fosforilação e resultando no aumento do tônus muscular (Fu et al., 1998; Ishizaki et al., 2000; Zhu et al., 2011). Portanto, podemos inferir que, se houver o bloqueio da sinalização da Rho por meio da Rho-quinase, poderíamos esperar que as respostas contráteis do músculo liso fossem atenuadas por meio do mecanismo de inibição da miofosfatase.

Diversos estudos mostram a relação entre Rho-quinase e hiperresponsividade das vias aéreas, o inibidor de Rho-quinase é capaz de relaxar completamente a musculatura lisa de vias aéreas (Yoshi et al., 1999; Lizuka et al., 2000, Zhu et al., 2011). Foi recentemente demonstrado que a inibição da Rho-quinase específica está associada com a redução no recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas e no parênquima pulmonar em cobaias com inflamação alérgica pulmonar crônica, além de contribuir para a redução do processo de remodelamento, demonstrando menor conteúdo de colágeno e fibras elásticas nas paredes das vias aéreas e tecido pulmonar (Possa et al., 2012; Righetti et al., 2014).

Possa et al. 2012 também demonstraram correlações positivas entre as respostas funcionais, marcadores de inflamação e remodelamento quando

realizou o tratamento com o inibidor de Rho-quinase (Y-27632) em animais sensibilizados através da redução do número de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, MMP-9, TIMP-1, NFκB, IFN-γ e isoprostano comparado com o grupo não tratado ($p < 0,05$).

Além de potenciais diferenças na localização subcelular, a expressão de ROCK1 e ROCK2 varia entre diferentes tecidos. No rato, ROCK1 mRNA é expresso ubiquamente, exceto no cérebro e músculo, enquanto que o mRNA de ROCK2 é expressado abundantemente no cérebro, músculo, coração, pulmão e placenta (Nakagawa et al., 1996). Em uma revisão recente, Julian e Olson (2014) analisaram a expressão de ambas as quinases com base em marcadores de sequências expressas, confirmando a maior abundância de ROCK2 de coração e cérebro e sugerindo uma expressão mais proeminente de ROCK1 nas células do sangue e do timo (Hartmann, Ridley e Lutz, 2015).

Referente a inflamação das vias aéreas a Rho-quinase participa atuando na quimiotaxia de eosinófilos induzida pela eotaxina e na migração de eosinófilos por meio das células endoteliais. Além disso, também está relacionada com células que participam da inflamação nas vias aéreas, tais como a migração transendotelial de monócitos, de neutrófilos, na polarização e migração de linfócitos T, bem como na regulação de células dendríticas, incluindo mudanças na morfologia celular, adesão, produção de IL-12 e interações com células T. Podendo-se concluir que a utilização de inibidores da Rho-quinase pode ser muito benéfica para estes pacientes, atuando como um anti-inflamatório (Fernandes et al., 2007).

A inibição da Rho-quinase também resulta em redução da liberação de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 de células T periféricas ativadas em indivíduos normais (Aihara *et al.*, 2003), e em indivíduos asmáticos, é capaz de reduzir a liberação de IL-2 e IL-5, porém reduz pouco a liberação de IL-4 e IFN- γ (Aihara *et al.*, 2004). De qualquer forma, embora não contribua positivamente no equilíbrio Th-2, o efeito anti-inflamatório está presente, uma vez que a elevação de IFN- γ está relacionada ao aumento da responsividade das vias aéreas (Hacken *et al.*, 1998), aumento na produção de IL-4 contribuindo para o excesso de produção de IgE e facilitando a inflamação alérgica em asmáticos (Kawano e Noma, 1995). Pigati *et al.* (2015), demonstraram que o tratamento de cobaias com o inibidor da Rho-quinase associado ao corticóide dexametasona diminuiu as respostas de mecânica após desafio com antígeno, reduziu a inflamação, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo nos pulmões.

Em relação ao remodelamento das vias aéreas, a Rho-quinase está envolvida na proliferação de miócitos e parece ter um papel no desenvolvimento de fibrose e na migração de células musculares lisas das vias aéreas e fibroblastos. Todas essas ações contribuem para o remodelamento tecidual (Fernandes *et al.*, 2007).

Kudo *et al.* (2012) sugerem relação entre IL-17 e Rho-quinase, demonstrando que a IL-17 também pode aumentar a contratilidade do músculo liso das vias aéreas e o estreitamento das vias aéreas por indução de RhoA nas células do músculo liso das vias aéreas.

Em conclusão, a ativação da via de Rho-quinase contribui para a potencialização da hiperresponsividade, inflamação, processo de remodelamento da matriz extracelular e ativação do estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que os inibidores de Rho-quinase representam potenciais ferramentas farmacológicas para o controle da asma.

1.7 Propriedades das vias aéreas distais e parênquima pulmonar

A inflamação distal tem sido descrita como mais intensa do que a observada em vias aéreas proximais, assim como a presença de alterações de remodelamento nas vias aéreas distais (Tulic et al., 2003; Tulic et al., 2006). Kotaru et al. (2006) estudando biópsias de pacientes asmáticos, isolaram fibroblastos das vias aéreas e do parênquima distal, e compararam a sua morfologia, proliferação, expressão de actina e a síntese de pró-colágeno tipo I e eotaxina. Os resultados encontrados foram que os fibroblastos das vias aéreas são morfologicamente distintos dos fibroblastos do parênquima pulmonar. Os fibroblastos do parênquima distal são mais largos, com aparência estrelada e com mais projeções citoplasmáticas.

Os fibroblastos das vias aéreas sintetizam mais pró-colágeno tipo I após estímulo com TGF- β . Estes estudos sugerem que dois tipos de fibroblastos existem no pulmão. Estas diferenças estruturais podem explicar, pelo menos parcialmente, frente a um estímulo lesivo a diversidade de resposta de reparação observada em vias aéreas proximais e distais no pulmão e no parênquima de pacientes asmáticos e com outras doenças respiratórias (Kotaru et al, 2006).

Lanças et al. (2006) avaliaram a mecânica das tiras de parênquima pulmonar em cobaias sensibilizadas a ovoalbumina, tentando reproduzir resposta inflamatória imediata e tardia, demonstraram que o parênquima pulmonar também responde com reação imediata e tardia e a resposta tardia esteve relacionada à inflamação eosinofílica.

Atualmente, uma série de evidências sugere a inflamação das vias aéreas e o remodelamento como característicos da asma, e estas evidências não ocorrem somente em vias aéreas centrais, mas também no pulmão distal e parênquima pulmonar. As vias aéreas distais são altamente reconhecidas como determinante na obstrução ao fluxo aéreo. A inflamação distal tem papel crucial na hiperresponsividade, na asma noturna e exacerbações (Calhoun, 2003).

1.8 Estresse oxidativo e asma

As células inflamatórias dos asmáticos possuem uma capacidade aumentada de gerar radicais livres quando comparados com controles, os quais posteriormente contribuem para altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS). Numerosos mediadores pró-inflamatórios biologicamente ativos levam ao aumento da produção de ROS e óxido nítrico (NO). O aumento persistente da ROS e do NO na asma leva à formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Andreadis et al., 2003).

Elevados níveis de NO causam mudanças significativas nos pulmões de asmáticos como desequilíbrio entre as respostas dos linfócitos Th1 e Th2. O estresse oxidativo pode levar a muitos efeitos prejudiciais na função de vias aéreas, incluindo a contração da musculatura lisa, lesão epitelial, indução da

hiperresponsividade de vias aéreas, hipersecreção brônquica, apresentando um importante papel na fisiopatologia da asma (Nadeem et al., 2014). Um método utilizado para quantificar a injúria relacionada ao estresse oxidativo é a mensuração da peroxidação lipídica (Milne et al., 2007; Rogers e Cismowski, 2018).

A exposição a uma variedade de substâncias diferentes tais como alérgenos, gases poluentes, químicos, drogas, bactérias e vírus conduz o recrutamento e ativação das células inflamatórias nas vias aéreas de pacientes asmáticos, incluindo mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e plaquetas. As reações específicas alérgicas envolvendo o sistema imunológico adquirido são caracterizados pela produção de interleucinas IL-5 e o subsequente recrutamento e ativação dos eosinófilos. Em contraste, o estímulo que age via sistema imunológico inato conduz a produção do IL-8 e o subsequente recrutamento e ativação de neutrófilos. Entretanto, as duas vias conduzem a produção de ROS primariamente devido à queima respiratória das células inflamatórias ativadas (Wood, Gibson e Garg, 2003).

Na inflamação, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos, potencializando a ativação de linfócitos T e linfócitos B pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas. Também produzem ROS, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). O NO é produzido pelas óxido nítrico sintetases, principalmente a iNOS, ausente em macrófagos em repouso, mas induzida por ativação de TLRs em resposta aos

padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), especialmente na presença de INF- γ (Abbas e Lichtman, 2003).

As células inflamatórias ativadas respondem causando um dano respiratório com liberação de ROS para as células adjacentes. Durante a injúria do sistema gerador é ativado e libera superóxido ($O_2^{\cdot-}$) dentro da célula. Uma reação de dismutação, catalizada pela superóxido dismutase resulta na produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, na presença de íons de haleto (I^- , Cl^- , Br^-), reagirá para formar o ácido hipocloroso (HClO). Em eosinófilos, esta reação é catalizada pela peroxidase eosinofílica. Em neutrófilos, esta reação é catalizada pela mieloperoxidase. O HClO pode então reagir como $O_2^{\cdot-}$ ou Fe^{2+} para produzir outro forte oxidante, o radical hidroxila (OH). Durante esta “queima respiratória” as células inflamatórias liberam altas concentrações de $O_2^{\cdot-}$, OH, HClO e H_2O_2 que podem lesar as células adjacentes resultando em aumentos na quantidade de radicais livres nas células respiratórias teciduais (Wood; Gibson; Garg, 2003).

As ROS também podem induzir a produção de citocinas e quimiocinas por intermédio da produção do fator nuclear (NF)- κ B em células epiteliais brônquicas (Biagoli et al., 1999).

Várias citocinas podem estimular o aumento da produção de óxido nítrico (NO), o qual reage com o O_2 para a formação do peroxinitrito, uma espécie citotóxica que possui muitos efeitos danosos, incluindo a oxidação lipídica (Wells e Holian, 2007). O NO pode também ser convertido em nitrato o qual pode oxidar proteínas (Wu et al., 1998). Quantidades excessivas de ROS e RNS, que são

produzidas pelos asmáticos podem exceder as defesas antioxidantes e causar estresse oxidativo (Hanazawa et al., 2000).

A partir do substrato L-arginina ocorre síntese do óxido nítrico por intermédio da ação das isoformas óxido nítrico sintases (NOS) (Kenyon et al., 2008). Quando um grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina é quebrado, através de oxidação enzimática (Ceylan et al., 2005), a L-arginina é convertida em NO + L-citrulina (Kenyon et al., 2008). Essa reação é estereoespecífica, ou seja, somente a L-arginina é metabolizada, catalisada por um grupo de enzimas chamado óxido nítrico sintase (NOS) e alguns outros cofatores (Scott e Grasemann et al., 2014). Este processo é esquematizado na Figura 4.

Figura 4. Via de estresse oxidativo NO-Arginase. NO produzido a partir das óxido nítrico sintases, constitutivas e induzidas. Arginases metabolizam a L-arginina que estão envolvidas na precursão de L-Ornitina e L-Prolina gerando síntese de colágeno e proliferação celular promovendo remodelamento. O peroxinitrito gerado através da reação de O_2^- e NO é capaz de gerar dano celular, disfunção DNA, mitocôndria e hiperresponsividade.

São apresentadas três isoformas da enzima NOS, sendo duas constitutivas e uma induzida. A enzima constitutiva pode estar expressa nas

células endoteliais (eNOS) ou nos neurônios (nNOS) (Hesslinger et al., 2009). A forma induzida (iNOS), pode estar expressa em uma variedade de tecidos e órgãos e também no endotélio vascular, sendo sua produção estimulada pelo lipopolissacarídeo bacteriano ou por algumas citocinas como o TNF- α , IL-1 e IFN- γ (Moncada et al., 1991; Moncada et al., 1993). É responsável pela produção de quantidades nanomolares de NO e parece estar presente principalmente em várias doenças. Na asma, iNOS tem efeitos tóxicos e pró-inflamatórios, perpetuando e amplificando a inflamação de vias aéreas e parênquima pulmonar (Ricciardolo, 2004).

A IL-13 aumenta a expressão de iNOS e a produção de NO é avaliada pela FeNO (fração exalada de óxido nítrico), sabe-se que a FeNO é um bom índice da inflamação TH2 e se associa ao aumento de IL-13 na mucosa brônquica. Além disso, a FeNO também pode ser utilizada como um indicador da capacidade de resposta aos esteróides de forma mais consistente do que outros parâmetros. Tem sido mostrado que pacientes com níveis elevados de FeNO respondem melhor a terapia com esteróides, em comparação com aqueles com níveis mais baixos de FeNO (Bagnasco et al., 2016).

O NO atua em vários mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam as alterações funcionais e histopatológicas encontradas em pacientes asmáticos, sendo que a sua contribuição depende principalmente da enzima pela qual foi produzido. Barnes (1996), sugere que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma por causar relaxamento na musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC. No entanto, o NO derivado da enzima eNOS pode levar a vasodilatação nas arteríolas, com consequente

extravasamento de plasma e edema. A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS pode resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th2 contribuindo nos sinais e sintomas característicos da asma.

Prado et al. (2011) investigaram se a iNOS contribui para o remodelamento vascular brônquico induzido por inflamação pulmonar alérgica crônica. As cobaias foram submetidas a exposições de ovoalbumina e os animais receberam um tratamento de 1400W (inibidor-iNOS específico). Deposição de colágeno e de fibras elásticas bem como expressão de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β foram aumentadas na parede vascular brônquica em animais expostos a ovoalbumina. A inibição da iNOS reduziu todos os parâmetros estudados. Neste modelo, a inibição de iNOS reduziu o remodelamento extracelular vascular brônquico, controlando a deposição de colágeno e fibras elásticas em vasos pulmonares. Autores sugerem que este efeito pode estar associado a uma redução no TGF- β e na expressão vascular de MMP-9 / TIMP-1.

O metabolismo da arginina contribui para a manutenção da homeostase no sistema respiratório, e os desequilíbrios podem contribuir para a fisiopatogenia da asma (North et al., 2009). A arginase está envolvida na asma, no remodelamento das vias aéreas, inflamação e hiperresponsividade. Em estudo de Maarsingh et al. (2011) foi utilizado um inibidor específico de arginase, em modelo de cobaia de asma, demonstraram que a atividade de arginase pulmonar em cobaias desafiadas por alérgenos foi aumentada. O desafio com alérgenos também aumentou a massa da musculatura lisa e a contração máxima

de anéis traqueais desnudados, já nas cobaias tratadas com inibidor de arginase houve atenuação da hipertrofia da glândula de muco, hiperplasia de células caliciformes, eosinofilia e IL-13, além disso, a hipersensibilidade foi completamente anulada.

Meurs et al. (2002) demonstraram que a atividade da arginase em vias aéreas hiperresponsivas foi 3,5 vezes superior em comparação com grupos controles, e que a atividade de arginase, presumivelmente por competição com cNOS para o substrato comum, a L-arginina, contribui para a deficiência de NO e hiperresponsividade após a provocação de alérgeno. Ao competir por um substrato comum, arginase reduz a biodisponibilidade de L-arginina para NOS, limitando, portanto, a produção de NO (Benson, Hardy e Morris, 2011).

Existem dois subtipos de arginase: arginase I e II. Kenyon et al. (2008) demonstraram que a arginase II foi mais expressa nas vias aéreas de camundongos normais, enquanto que a arginase I foi indetectável em vias aéreas normais, sendo sua expressão aumentada nas vias aéreas de camundongos expostos a ovoalbumina.

Em estudo com modelo experimental de Aristoteles et al. (2013), o aumento do teor de arginase e células iNOS-positivas foram associadas com a constrição do parênquima pulmonar distal. Houve uma elevada expressão de 8-iso-PGF-2 α , que teve um efeito pró-contrátil, o mecanismo envolvido nessa resposta esteve relacionado à modulação da expressão de NF-kB, que contribuiu para a ativação das vias arginase e iNOS.

Os isoprostanos são um grupo de produtos de peroxidação lipídica que podem contribuir para muitas das mudanças fisiopatológicas vistas na asma (Wood, Gibson e Garg, 2003). A peroxidação da membrana lipídica leva a produção de isoprostanos, uma série de prostaglandinas bioativas (PG) F2-like. Isoprostanos são produzidos independentemente das enzimas ciclooxygenases via a peroxidação do ácido aracdônico, catalizada por radicais livres (Figura 5). Esta via tem a capacidade de formar 64 estruturas isoméricas, as quais o 8-iso-PGF-2 α é o mais bem caracterizado. Existem evidências significativas que sugerem que o 8-iso-PGF-2 α pode atuar, em parte, por meio da ligação ao receptor vascular de tromboxane A₂/PGH₂ (TP) (Takahashi et al.,1992). Este agente causa aumento da resistência pulmonar, indicando que o 8-iso-PGF2 α na via do estresse oxidativo pode ser um dos mediadores da limitação ao fluxo aéreo na asma, embora outros mediadores também exerçam esta função (Shiraki et al., 2009 e Jonasson et al., 2009).

Figura 5. Produção de isoprostano. Isoprostanos produzidos via a peroxidação do ácido aracdônico, gerando aumento da contração da musculatura e aumento da resistência pulmonar, e consequentemente obstrução do fluxo aéreo.

1.9 Fatores de transcrição

O NF- κ B age como um fator de transcrição, com ação descrita em diversas células que compõem os organismos, apresentando uma gama de ações superiores a todos os outros fatores de transcrição até então caracterizados (Xiao, 2004). Essa superioridade deve-se aos vários estímulos que o ativam como: neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, lipocorticóides, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, vírus, bactérias e o óxido nítrico sintase induzida (Panday et al., 2016).

NF- κ B é um fator nuclear que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de dez pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κ B) (Chen et al., 1999).

A família NF- κ B consiste de cinco subunidades, caracterizada por conter uma porção N – terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – Rel homology domain) – que se subdivide em uma região que se liga ao DNA e uma outra denominada de domínio de dimerização. Nesta última, encontra-se um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal difere entre cada subunidade, sendo que as subunidades p65, c-Rel e RelB contêm um domínio de transativação, necessária para iniciar a atividade transcricional (Hart et al., 1998).

De acordo com Gagliardo et al. (2003), a ativação exagerada de NF- κ B perpetua a produção de mediadores inflamatórios em asma grave. Existem um ou mais locais para a ligação de NF- κ B, proteínas que são reguladas

positivamente na asma, tais como IL-1, a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e iNOS (Hiscott et al., 1993).

Segundo Jadhav et al. (2006), independente do estímulo parece haver participação do estresse oxidativo e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF- κ B. Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (I κ B). Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação.

FOXP3, outro fator de transcrição, é predominantemente expresso por células T CD4⁺, CD25⁺, e pode se correlacionar com a atividade supressora destas células (Sweilam et al., 2008). Pacientes asmáticos têm diminuição da expressão de FOXP3 (Provoost et al., 2009).

FOXP3 também têm uma relação mutuamente inibitória com células Th17. O equilíbrio FOXP3 + Treg / Th17 desempenha um papel importante na manutenção da homeostase imunológica. Jiang et al. (2015) demonstraram que existe um desequilíbrio na razão Th1 / Th2 e a razão FOXP3 + Treg / Th17 em um modelo de asma experimental e que, provavelmente, este desequilíbrio interfere na fisiopatologia da asma (Jiang et al., 2015)

A ligação de IL-4 e IL-13 com os seus receptores que contêm a subunidade α do receptor de IL-4 (IL-4R α) resultam numa via de sinalização mediada por STAT6 e contribuem para o desenvolvimento de inflamação Th2. Uma vez fosforilado, o STAT6 é transportado para o núcleo, onde regula a expressão genética de várias proteínas e citocinas críticas para o equilíbrio entre

a defesa imunológica do hospedeiro e as respostas inflamatórias alérgicas. As principais células pulmonares que são profundamente alteradas pela sinalização STAT6, durante as respostas inflamatórias, incluem os linfócitos T e B, os macrófagos e as células estruturais, incluindo as células epiteliais das vias aéreas e as células da musculatura lisa (Hershey, 2003).

1.10 Sistema nervoso colinérgico

Três componentes principais compõem o sistema nervoso autônomo pulmonar: o adrenérgico, o colinérgico e o sistema não-adrenérgico não-colinérgico (NANC). O sistema NANC é composto de um conjunto de fibras sensitivas não-mielinizadas cujos processos terminais atingem as células epiteliais, vasos, musculatura lisa peribrônquica e glândulas mucosas. O sistema NANC apresenta dois grandes grupos: um componente inibitório (i-NANC) e outro excitatório (e-NANC), formam a via neural predominante dos broncoconstritores nas vias aéreas humanas, um causando broncodilatação e o outro broncoconstrição, respectivamente (Jonz et al., 2009).

Os receptores colinérgicos controlam a geração de muco das vias aéreas nas vias aéreas centrais e desempenham um papel significativo na asma (Rogers, 2004). Receptores muscarínicos estão envolvidos no crescimento e maturação da musculatura lisa de vias aéreas (Kistemaker et al., 2012).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor parassimpático fundamental nas vias aéreas. A acetilcolina controla as células alvo neuronais e não neuronais através de uma ação de curta duração nos receptores nicotínicos e muscarínicos. O controle mais importante sobre a liberação de acetilcolina, a

partir de nervos colinérgicos pós-ganglionares, é exercido pela própria acetilcolina (Kistemaker e Gosens, 2015).

O armazenamento de ACh em vesículas secretoras depende da atividade do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (Kolahian; Gosens, 2012).

Acetilcolina é sintetizada em terminais nervosos a partir de colina e acetil co-enzima A, pela enzima citoplasmática colina acetiltransferase (ChAT). ChAT e o seu produto acetilcolina estão presentes numa vasta gama de células não neuronais, incluindo células epiteliais e endoteliais, células da musculatura lisa bem como várias células do sistema imunitário, tais como linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Wessler e Kirkpatrick, 2001).

A ACh liberada pelo nervo vago, atuando através de receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR), presentes em macrófagos e outras células imunes, parece inibir a produção de citocinas e assim contribuir para neutralizar um estado contínuo de inflamação (Pavlov e Tracey, 2006).

A ativação de $\alpha 7$ nAChR não apenas inibe o NF-kB, mas também ativa a Janus quinase-2 e o transdutor de sinal e ativador da via de transcrição 3 (JAK-STAT3). Esta via está envolvida na regulação de várias funções celulares e faz parte da sinalização química essencial para induzir a produção de citocinas. No entanto, o JAK2-STAT3 pode, por sua vez, neutralizar a inflamação, regulando a atividade do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS-3), (Pavlov; Tracey, 2006 e Murray, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Foi demonstrado anteriormente que indivíduos portadores de asma grave de difícil controle apresentam elevação da IL-17 e aumento da atividade da proteína Rho-quinase em suas vias aéreas. Esta elevação esteve correlacionada com aumento da infiltração de células inflamatórias, produção de quimiocinas e gravidade de hiperresponsividade (Wang, Wills-Karp, 2011; Possa et al., 2012; Righetti et al., 2014).

Considerando que formas graves de asma têm se mostrado difíceis de tratar com as terapias existentes, a modulação da via da IL-17 e da proteína Rho-quinase podem ser promissoras para o tratamento desta doença.

Devido as controvérsias quanto as funções da IL-17 e os efeitos positivos dos inibidores da proteína Rho-quinase em modular a inflamação através da quimiotaxia, do controle de crescimento e migração celular, organização do citoesqueleto, adesão e motilidade celular, remodelamento da matriz extracelular, hiperreatividade do músculo liso, além de modulação da contração da musculatura lisa, mais estudos são necessários para investigar o uso do anti-IL17 associada ou não ao inibidor da proteína Rho-quinase na efetividade do tratamento da doença pulmonar inflamatória crônica. Portanto no presente estudo buscamos novas alternativas terapêuticas para a doença.

3 OBJETIVO

Estudar os efeitos dos tratamentos com anticorpo neutralizador anti-IL17 e do inibidor da Rho-quinase, associados ou não, em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica, avaliando:

1- A hiperresponsividade à metacolina na resposta da mecânica do sistema respiratório.

Nas vias aéreas e nos septos alveolares foram quantificados:

2- O número de células positivas para a proteína Rho-quinase 1 e Rho-quinase 2;

3- O recrutamento eosinófilico, células dendríticas, células CD4⁺ e CD8⁺;

4- Elementos da matriz extracelular: Fibras colágenas, decorina, fibronectina, biglicano e TGF- β ;

5- A resposta de estresse oxidativo: Conteúdo de 8-iso-PGF-2 α e número de células positivas para iNOS;

6- O número de células positivas para: FOXP-3, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17;

7- Expressão celular de: MMP9, MMP12, TIMP1;

8- Expressão celular e atividade do NF-kappaB;

9- Expressão gênica de IL-17, VACHT e de arginase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 064/15).

Foram utilizados 64 camundongos machos BALB/c provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985).

Em média, o peso corporal dos animais foi de aproximadamente 20-25g no momento de iniciar o protocolo de sensibilização, com idade de 6-7 semanas. Houve 2 perdas de animais no biotério por brigas entre os mesmos, não houve perdas durante o protocolo.

4.1 Grupos experimentais

O protocolo experimental incluiu 8 grupos (n=8 para cada grupo):

A) Grupo SAL: inalações e injeções via intraperitoneal (i.p) com soro fisiológico (SF) estéril (nº=8);

B) Grupo OVA: inalações e injeções via i.p com solução de ovoalbumina (OVA) (nº=8);

C) Grupo SAL-RHOi: inalações e injeções via i.p com SF estéril e tratamento com o inibidor da Rho-quinase (nº=8);

D) Grupo OVA - RHOi: inalações e injeções via i.p com solução de OVA e tratamento com o inibidor da Rho-quinase (nº=8);

E) Grupo SAL - anti-IL17: inalações e injeções via i.p com SF estéril e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17 (nº=8);

F) Grupo OVA - anti-IL17: inalações e injeções via i.p com solução de OVA e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17 (nº=8);

G) Grupo SAL - RHO - anti-IL17: inalações e injeções via i.p com SF estéril, tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17 e tratamento com o inibidor da Rho-quinase (nº=8);

H) Grupo OVA - RHOi - anti-IL17: inalações e injeções via i.p com solução de OVA, tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17 e tratamento com o inibidor da Rho-quinase (nº=8).

4.2 Protocolo de sensibilização

Para produzir o modelo de inflamação pulmonar foi injetado um antígeno (ovoalbumina) via parenteral para induzir uma sensibilização sistêmica e o mesmo antígeno foi administrado pelas vias aéreas, o foco do processo inflamatório, por aerossol. A Figura 6 mostra o protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina, este teve a duração de 28 dias.

Os camundongos receberam solução de 50 µg de ovoalbumina (Sigma - Aldrich) e 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) em um volume total de 0,2 ml por via intraperitoneal nos dias 1 e 14. Nos dias 22, 24, 26 e 28 os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/ml (1%). O tempo em que os animais estiveram em contato com o aerossol foi de 30 minutos. Ao mesmo tempo, o grupo controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alumen) (6 mg) por via i.p. e nos dias 22, 24, 26, 28 foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos.

Os estudos de mecânica respiratória e histopatológicos foram realizados vinte e quatro horas (24 horas) após o último desafio antigênico, ou seja, no dia 29 (Camargo *et al.*, 2018).

4.3 Tratamento com o anticorpo monoclonal anti-IL17

A administração do anticorpo neutralizador anti-IL17 (R and D Systems, Abingdon, UK) foi administrado por via intraperitoneal 1 hora antes de cada administração de aerossol nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo experimental de asma na dose de 7,5 µg/aplicação, baseando-se no protocolo de Barlow *et al.* (2011).

4.4 Tratamento com o inibidor da Rho-quinase

Foi utilizado no estudo um inibidor da Rho-quinase altamente seletivo, o (+)-(R)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride, monohydrate (Y-27632). Baseado no protocolo de Henry et al. (2005), nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo experimental os camundongos receberam Y-27632 (10 mg/kg) administrado por via intranasal 1 hora antes de cada desafio com ovoalbumina.

4.5 Avaliação da mecânica pulmonar

Após 24 horas do término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/kg i.p.) e traqueostomizados. Uma cânula de plástico foi inserida e atada com fio pelo orifício da traqueostomia. Os animais foram conectados a um aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais Harvard 683 (*Harvard Aparelho, South Natick, Mass., EUA*) e ventilados com volume corrente de 10 ml/kg, frequência respiratória de 120 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal. Para abolir seu esforço ventilatório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg i.p.).

Os sinais de pressão traqueal e o volume foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão (*Honeywell 163PC01D36, Freepot, IL*) e convertidos por placa analógica digital (*DT01EZ, Data Translation, Malboro, MA*). Os valores de resistência e elastância do sistema respiratório foram calculados através da equação do movimento do sistema respiratório, descrita a seguir:

- $P_{tr}(t) = R_{rs} \cdot V'(t) + E_{rs} \cdot V(t)$, onde: t é tempo, P_{tr} é pressão traqueal, R_{rs} é resistência do sistema respiratório, E_{rs} é elastância do sistema respiratório V' é fluxo aéreo e V é o volume pulmonar.

Durante a ventilação mecânica foi realizada a medida basal de resistência e elastância dos animais após 30 segundos de ventilação. Em seguida, foi realizado o desafio com inalação de metacolina nas doses de 3, 30, 300mg/ml, no primeiro, segundo, e terceiro minuto e obtidas as medidas de resistência e elastância do sistema respiratório. Foi considerada para o estudo a resposta máxima de resistência (% R_{rs}) e elastância (% E_{rs}) do sistema respiratório.

Ao final da avaliação, os camundongos receberam através da injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50mg/Kg i.p) e foram heparinizados (1000 IU) por via intravenosa imediatamente antes da secção da aorta abdominal e veia cava. A parede torácica anterior foi aberta e os pulmões foram removidos em bloco com o coração para os estudos morfométricos e análises histológicas.

A diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio ótico com objetiva de imersão (1000x).

4.7 Histologia e imunohistoquímica

Após a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 µm de espessura e as lâminas foram coradas conforme a descrição a seguir. Para a coloração de Picro-Sirius (fibras colágenas), os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram coradas por 1 hora no Picro-Sírius à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos.

Para marcação das demais amostras os procedimentos foram realizados na seguinte sequência: recuperação antigênica, bloqueio e incubação com anticorpo primário (Tabela 1), incubação com complexo de anticorpo secundário, coloração e contraste, sendo descrito: primeira desparafinação, seguida de hidratação, digestão ou recuperação de antígeno a alta temperatura na panela de vapor por 50 minutos (anti-IL4, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-13, anti-IL-17) ou panela de pressão por 1 minuto (anti-iNOS, anti NF-kappaB, anti TGF-β, anti TNF-α, anti TIMP-1, anti MMP-12, anti MMP-9, anti CD4⁺, anti CD8⁺, anti células dendríticas, anti FOXP-3, anti-15F2t-isoprostano, anti ROCK1 e anti ROCK2) usando tampões de Citrato PH6, após essa etapa, o bloqueio de peroxidase foi realizado usando 10 volumes de peróxido de hidrogênio (3%) durante 5 minutos e lavado 3 vezes com PBS. Os anticorpos diluídos foram

pipetados no tecido e as lâminas foram incubadas numa câmara úmida durante a noite (18 a 20 horas).

Após incubação das lâminas no refrigerador e lavagem com PBS elas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário vetor (coelho, rato, cabra ou camundongo) por 30 minutos a 37°C, e lavadas novamente 3x3 minutos PBS e depois incubadas em câmara úmida com o Complexo Conjugado Vector AB por 30 minutos a 37° C, lavadas novamente em PBS e desenvolvidas na solução cromogênica (70 mg de DAB por 110 ml de tris-HCL). As secções foram coradas com hematoxilina de Harris e as lâminas foram montadas.

Após estes procedimentos, os cortes de pulmão foram analisados usando a técnica morfométrica descrita a seguir.

Tabela 1. Titulação dos anticorpos

Marcador	Diluição	Anticorpo primário	Especificação	Marcador	Diluição	Anticorpo primário	Especificação
Rho Quinase 1	1:50	Anti-goat	SC-1851 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	CD4+	1:300	Anti-rat	SC-13573 Rat Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
Rho Quinase 2	1:400	Anti-goat	SC-6055 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	CD8+	1:600	Anti-mouse	YTS-169AG Rat Monoclonal; Thermo Fis, Sci, CA, USA
IL-1 β	1:200	Anti-rabbit	SC-7884 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz, Biotechnonology, CA, USA	Decorin	1:600	Anti-goat	SC-22613 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-2	1:250	Anti-rabbit	SC-7896 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	NFK β	1:800	Anti-rabbit	SC-109 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-4	1:300	Anti-goat	SC-1260 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	TIMP-1	1:400	Anti-rabbit	LS-C299465 Mouse Polyclonal; LifeSpan BioScien, Inc, WA, USA
IL-5	1:500	Anti-rabbit	SC-7887 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	MMP-9	1:50	Anti-rabbit	SC-6840 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-6	1:600	Anti-goat	SC-1265 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	MMP-12	1:400	Anti-rabbit	SC-30072 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-10	1:300	Anti-mouse	SC-73309 Rat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	TGF- β	1:200	Anti-rabbit	SC-146 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-13	1:600	Anti-goat	SC-1776 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	TNF α	1:100	Anti-mouse	SC-52746 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-17	1:800	Anti-rabbit	SC-73309 Rabbit Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	iNOS	1:200	Anti-mouse	N-32020 Mouse Monoclonal; BD transduction Lab. CA, USA
Isoprostano	1:1500	Anti-goat	IS- 20 Goat Polyclonal; Oxford Biomed. Resear, MI, USA	Fibronectina	1:600	Anti-goat	SC-22613 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA
FOXP3	1:300	Anti-mouse	SC-53876 Mouse Monoclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA	Biglicano	1:1200	Anti-goat	SC-27936 Goat Polyclonal; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA

4.8 Análise morfométrica

Para a contagem de células de: CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, FOX-P3, NF-kappaB, iNOS, ROCK-1, ROCK2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TGF- β e TNF- α foi utilizada a técnica de contagem de pontos (Weibel, 2010) com o retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio (E200MV, Nikon Corporation, Tokyo, Japan), onde os pontos coincidentes com as estruturas a serem analisadas foram divididos pelo número total de pontos. A área total do retículo é de 10⁴ μ m². Para quantificar as células positivas para vias aéreas o retículo foi fixado na base do epitélio (Figura 7). Foi realizada a razão entre o número de células positivas em determinada área e o número de pontos que coincidiram com a área peribrônquica para vias aéreas, e razão entre o número de células positivas na área do retículo e o número de pontos que coincidiram com os septos alveolares. As análises foram realizadas em aumento x1000 (Tibério et al., 1997, Leick-Maldonado et al., 2004).

Figura 7. Contagem de pontos na parede da via aérea.

4.9 Analisador de imagens

As fibras colágenas, decorina e conteúdo de 8-iso-PGF-2 α foram analisados por meio do analisador de imagem (*Image-Pro Plus*), a medida de densidade óptica foi o método empregado para a análise. A captura das imagens foi realizada por meio de sistema de análise de imagens composto de microscópio *Leica DM2500* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*), com câmara de vídeo acoplada, que enviará as imagens por meio de placa digitalizadora de imagens a um computador. Através de um "software" as imagens foram adquiridas e processadas. Para a quantificação descrita foram realizadas fotos de vias aéreas e parênquima no aumento de 1000x. Para todos os estudos foram analisados dez campos por lâmina dos septos alveolares e quatro vias aéreas em cada animal. A análise de imagens foi realizada através do "software" *Image-Pro Plus 4.5*. Este "software" permite que lhe seja informado um "threshold" dos tons de cores que representam as áreas positivas e assim

quantificar estas na área determinada previamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de área (Camargo et al, 2018; Righetti et al, 2014).

4.10 Expressão gênica (RT-PCR)

A PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR) tornou-se a técnica de referência para o estudo da expressão gênica nos últimos anos. A aplicação de RT-PCR ao estudo da asma fornece informações muito úteis sobre os mecanismos de expressão gênica.

Para a extração de RNA das amostras foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies) e kit de extração (Qiagen, RNeasy Mini Kit 250) para extração em coluna, como descrito a seguir. Aos tubos contendo as amostras de pulmão, foram adicionadas 400µL de Trizol, e armazenados em freezer -80°C. No dia da extração, estas foram homogeneizadas (Vórtex, 15 segundos), seguido da adição de 200µL de clorofórmio. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fase superior transparente formada com a centrifugação foi transferida para tubos de 1,5 mL e adicionados 350µL de etanol (70%). Essa mistura foi rapidamente homogeneizada no vórtex e transferida para a coluna. Estas foram centrifugadas (8000 rpm, 1 minuto), a parte inferior (que passou pela coluna) foi descartada e foram adicionados 700µL de RW1 (tampão RW1 – *wash buffer*). As amostras foram novamente centrifugadas, a parte inferior descartada e 500µL de RPE (tampão RPE – *wash buffer*) foram adicionados à coluna. Este último passo foi feito duas vezes. Após

as lavagens, as amostras foram centrifugadas de modo a retirar todo o líquido de tampão de lavagem que ficou na coluna durante o processo.

Finalmente, foram adicionados 20 µL de água ultrapura (livre de RNase e DNase) nas amostras, que foram centrifugadas pela última vez para que o RNA extraído passasse pela coluna e decantasse no fundo do tubo de 1,5 mL. As colunas utilizadas foram então descartadas e as amostras armazenadas em freezer -80 °C.

A determinação da concentração de RNA extraído foi realizada a 260 nm em espectrofotômetro Spectra Max Plus384 (*Molecular Devices*), utilizando-se 2 µL da solução, em duplicata. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total com o kit da Superscript III (*Invitrogen*) seguindo as recomendações do fabricante. O PCR foi realizado com o kit SyberGreen (Sigma, USA), seguindo criteriosamente as recomendações do fabricante, e foram realizados os experimentos de PCR em tempo real a partir das amostras de cada grupo experimental. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software disponibilizado pelo fabricante. Resumidamente, o número arbitrário de cópias dos genes de interesse e constitutivos foram calculados pela fórmula $(1000000/2^{CT})$ para cada amostra, onde CT é o número de ciclos de amplificação necessários para atingir o limiar determinado na fase exponencial da curva (Radonic et al. 2004).

As sequências de primers e temperaturas foram: GAPDH (5'–3' sense: CCACCACCCTGTTGCTGTAG; 5'–3' antisense: CTTGGGCTACACTGAGGACC; 60°C; NM_008084), VACHT (5'-3' sense:

CCCTTTTGATGGCTGTG; 5'-3' antisense: GGGCTAGGGTACTCATTAGA; 60°C; NM_10167164), IL-17 (5'-3 sense: TGAAGGTCAACCTCAAAGTCT; 5'3'antisense: GAGGGATATCTATCAGGGTCTTCAT) e ARG-1 (5'-3 sense: GCACTCATGGAAGTACACGAGGAC, 5'3'antisense: CCAACCCAGTGATCTTGACTGA). Os resultados foram obtidos como o número de ciclos em que os gráficos de PCR logarítmica cruzam uma linha de limiar calculada e são usados para determinar valores de ΔCt [$\Delta Ct = (Ct \text{ do gene alvo}) - (Ct \text{ do gene constitutivo})$]. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias (UA) usando a fórmula: Expressão= $1000 \times (2^{-\Delta Ct})$ UA.

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa SigmaPlot® Version 11.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Para determinar a diferença entre os grupos com significância estatística foi utilizada a análise unidirecional de variância (ANOVA) seguido pelo método de Holm-Sidak para comparações múltiplas, sendo estes resultados expressos na forma de média e erro padrão e o gráfico na forma de barras e todos os dados são representados como médias $\pm$ desvio padrão. Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises.

5 RESULTADOS

Não houve diferenças entre os grupos controles SAL, SAL - RHOi, SAL - anti-IL17, e SAL - RHOi - anti-IL17 em todos os parâmetros avaliados: hiperresponsividade, inflamação, remodelamento e estresse oxidativo. Para facilitar a visualização dos gráficos foi optado por utilizar apenas um resultado dos controles nos gráficos.

5.1 Hiperresponsividade à metacolina

A porcentagem de aumento máximo da resistência do sistema respiratório (%Rrs) após o desafio com metacolina está mostrada na Figura 8. Houve um aumento significativo da %Rrs no grupo OVA ($73,6 \pm 6,1\%$) comparado ao grupo controle (SAL: $9,1 \pm 1,8\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor da Rho-quinase, com o anti-IL17 e a associação dos dois, atenuou esta resposta (OVA - RHOi: $31,3 \pm 0,9\%$, OVA - anti-IL17: $35,3 \pm 8,5\%$ e OVA - RHOi - anti-IL17: $9,4 \pm 1,4\%$), comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição da %Rrs na associação dos dois tratamentos quando comparado aos tratamentos isolados ($p < 0,05$).

Figura 8. Média $\pm$ erro padrão da porcentagem máxima de aumento da resistência do sistema respiratório, obtida após desafio de metacolina. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado com os grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17.

A porcentagem de aumento máximo da elastância do sistema respiratório (%Ers) após o desafio com metacolina é mostrado na Figura 9. Também houve aumento da %Ers no grupo OVA ($60,7 \pm 5,7\%$) comparado ao grupo controle SAL ($25,0 \pm 5,1\%$), ($p < 0,05$). Os grupos tratados: OVA - RHOi ($48,0 \pm 8,2\%$), OVA - anti-IL17 ($31,6 \pm 5,5\%$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($22,0 \pm 3,3\%$) apresentaram diminuição quando comparados ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição da %Ers no grupo OVA-RHOi-anti-IL17 comparado ao grupo OVA - RHOi ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos que foram tratados e o grupo controle SAL.

Figura 9. Média $\pm$ erro padrão da porcentagem máxima de aumento da elastância do sistema respiratório, obtida após desafio de metacolina. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo OVA; & $p < 0,05$ comparado com o grupo OVA-RHOi.

O número de células ROCK1 positivas nas vias aéreas está mostrado na Figura 10. Houve um aumento de células positivas ROCK1 nas vias aéreas no grupo OVA ($11,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,3 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $3,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,01 \pm 0,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou a células ROCK1 positivas nas vias aéreas em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nota-se uma atenuação das células ROCK1 positivas nos grupos tratados com inibidor de Rho-quinase e no grupo com a associação dos tratamentos com anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase, comparativamente com o grupo OVA-anti-IL17 ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 10. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para ROCK1 nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

O número de células ROCK1 positivas nos septos alveolares pode ser observado na Figura 11. Houve um aumento de células ROCK1 positivas nos septos alveolares no grupo OVA ($5,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,6 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com OVA - RHOi ($4,4 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,6 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,4 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células ROCK1 positivas nos septos alveolares comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos septos alveolares, a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou as células positivas para ROCK1 quando comparado ao grupo tratado apenas com anti-IL17 ou inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$).

Figura 11. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para ROCK1 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, # $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

O número de células ROCK2 positivas nas vias aéreas está mostrado na Figura 12. Houve um aumento de células positivas ROCK2 nas vias aéreas no grupo OVA ($5,5 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,8 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $1,0 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $1,2 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,02 \pm 0,02$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou a células ROCK2 positivas nas vias aéreas comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 12. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para ROCK2 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células ROCK2 positivas nos septos alveolares pode ser observado na Figura 13. Houve um aumento de células ROCK2 positivas nos septos alveolares no grupo OVA ($7,1 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,9 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com OVA - RHOi ($5,1 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($5,1 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($3,1 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células ROCK2 positivas nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos septos alveolares, a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou as células positivas para ROCK2 quando comparado ao grupo tratado apenas com anti-IL17 ou inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$).

Figura 13. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para ROCK2 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, # $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

5.2 Inflamação

A Figura 14 demonstra a quantidade de células totais no fluido do lavado broncoalveolar. Houve um aumento significativo do número de células totais no grupo OVA ($3,2 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/ml) comparado ao grupo controle (SAL: $0,08 \pm 0,02 \cdot 10^4$ células/ml), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor da Rho-quinase (OVA - RHOi: $1,01 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/ml), com o anti-IL17 ($0,1 \pm 0,006 \cdot 10^4$ células/ml) e a associação dos dois (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,06 \pm 0,01 \cdot 10^4$ células/ml), atenuou o número de células totais comparados ao grupo OVA, ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos SAL e os grupos tratados.

Figura 14. Média $\pm$ erro padrão do número de células totais no fluido do lavado broncoalveolar. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-anti-IL17.

A Figura 15 demonstra o valor de quantidade de eosinófilos no fluído do lavado broncoalveolar. Houve um aumento significativo do número de eosinófilos no grupo OVA ($1,5 \pm 0,7 \cdot 10^4$ células/ml) comparado ao grupo controle (SAL: $0,001 \pm 0,0004 \cdot 10^4$ células/ml), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor da Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,1 \pm 0,07 \cdot 10^4$ células/ml), com o anti-IL17 (OVA – anti-IL17: $0,01 \pm 0,007 \cdot 10^4$ células/ml) e a associação dos dois (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,008 \pm 0,003 \cdot 10^4$ células/ml), atenuou o número de eosinófilos comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre o grupo controle e os grupos de tratamento.

Figura 15. Média $\pm$ erro padrão do número de eosinófilos no fluído do lavado broncoalveolar. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo OVA.

A Figura 16 demonstra o valor de quantidade de macrófagos no fluído do lavado broncoalveolar. Houve um aumento do número de macrófagos no grupo OVA ($1,6 \pm 0,4 \cdot 10^4$ células/ml) comparado ao grupo controle (SAL: $0,08 \pm 0,02 \cdot 10^4$ células/ml), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor da Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/ml), com o anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $0,07 \pm 0,01 \cdot 10^4$ células/ml) e a associação dos dois (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,05 \pm 0,009 \cdot 10^4$ células/ml), atenuou o número de macrófagos comparados ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre o grupo controle e os grupos de tratamento.

Figura 16. Média $\pm$ erro padrão do número de macrófagos no fluído do lavado broncoalveolar. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo OVA.

A Figura 17 demonstra o valor da quantidade de neutrófilos no fluído do lavado broncoalveolar. Não houve diferenças entre os grupos.

Figura 17. Média $\pm$ erro padrão do número de neutrófilos no fluído do lavado broncoalveolar.

A Figura 18 demonstra o valor da quantidade de linfócitos no fluído do lavado broncoalveolar. Não houve diferenças entre os grupos.

Figura 18. Média $\pm$ erro padrão do número de linfócitos no fluído do lavado broncoalveolar.

Os valores dos números de células positivas para CD4⁺ nas vias aéreas em todos os grupos experimentais podem ser observados na Figura 19. Houve um aumento de células positivas para CD4⁺ nas vias aéreas dos animais do grupo OVA ($7,1 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo controle SAL ($0,08 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O número de células positivas nos grupos OVA - RHOi ($4,2 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,8 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($2,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 19. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD4⁺ nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

Os valores do número de células positivas para CD4⁺ nos septos alveolares podem ser observados na Figura 20. Houve um aumento de células positivas para CD4⁺ nos septos alveolares dos animais do grupo OVA ($10,5 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos animais do grupo SAL ($0,8 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O número de células positivas no grupo OVA - RHOi ($2,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($2,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($2,3 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo controle SAL e o grupo tratado com a associação de anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase.

Figura 20. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD4⁺ nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para CD8⁺ nas vias aéreas em todos os grupos experimentais podem ser observadas na Figura 21. Houve um aumento de células positivas para CD8⁺ nas vias aéreas dos animais dos grupos OVA (23,7±2,2 células/10⁴µm²) comparativamente ao grupo controle SAL (2,0±1,1 células/10⁴µm²), $p<0,05$. Os grupos OVA - RHOi (13,59±2,5 células/10⁴µm²) e OVA - anti- IL17 (8,7±3,2 células/10⁴µm²) apresentaram aumento no número de células positivas comparativamente ao grupo controle SAL ($p<0,05$). O número de células positivas nos grupos tratados OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 (4,6±0,8 células/10⁴µm²) foi menor em comparação ao grupo OVA ($p<0,05$). Não houve diferença entre o grupo tratado com a associação de anti-IL17 ao inibidor de Rho-quinase comparativamente ao grupo controle SAL.

Figura 21. Gráfico de barras mostrando média ± erro padrão para o número de células positivas para CD8⁺ nas vias aéreas. * $p<0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p<0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p<0,05$ comparado ao grupo OVA-RHOi, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para CD8⁺ nos septos alveolares pode ser observado na Figura 22. Houve um aumento de células positivas para CD8⁺ nos septos alveolares dos animais do grupo OVA ($14,7 \pm 1,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo controle (SAL: $0,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O número de células positivas no grupo OVA - RHOi ($6,1 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($5,7 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($2,9 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 22. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD8⁺ nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-1 β nas vias aéreas está mostrado na Figura 23. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para IL-1 β no grupo OVA ($12,6 \pm 2,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos OVA - RHOi ($4,6 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($4,7 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($3,5 \pm 1,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-1 β comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17, e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados com o grupo controle SAL.

Figura 23. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-1 β nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares está mostrado na Figura 24. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para IL-1 β no grupo OVA ($20,2 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($11,8 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($1,0 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($14,8 \pm 1,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($10,9 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-1 β comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17, e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados com o grupo controle SAL.

Figura 24. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-2 nas vias aéreas está mostrado na Figura 25. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para IL-2 no grupo OVA ($4,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($1,1 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos OVA - RHOi ($1,1 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($2,3 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-2 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17, e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados com o grupo controle SAL.

Figura 25. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-2 nos septos alveolares está mostrado na Figura 26. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para IL-2 no grupo OVA ($3,2 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,9 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($1,0 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,0 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-2 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17, e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados com o grupo controle SAL.

Figura 26. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas está mostrado na Figura 27. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para IL-4 no grupo OVA ($4,1 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais no grupo OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,1 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-4 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA - RHOi ($2,0 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,3 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA. Não houve diferença entre o grupo OVA - RHOi - anti-IL17 e o grupo SAL.

Figura 27. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-4 nos septos alveolares está mostrado na Figura 28. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para IL-4 no grupo OVA ($5,2 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,8 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($2,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($5,5 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,4 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-4 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diferença entre o grupo OVA - RHOi - anti-IL17 comparativamente aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17 ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo OVA - RHOi - anti-IL17 e o grupo controle SAL.

Figura 28. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-4 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas está mostrado na Figura 29. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para IL-5 no grupo OVA ($5,1 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,9 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos OVA - RHOi ($2,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,5 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,6 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-5 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nas vias aéreas a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou a expressão de células positivas para IL-5 quando comparado ao grupo tratado apenas com anti-IL17 ou inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo tratado com a associação do anti-IL17 ao inibidor de Rho-quinase quando comparado ao grupo controle SAL.

Figura 29. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-5 nos septos alveolares está mostrado na Figura 30. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para IL-5 no grupo OVA ($5,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,3 \pm 0,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($2,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,8 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-5 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos septos alveolares a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou a expressão de células positivas para IL-5 quando comparado ao grupo tratado apenas com anti-IL17 ou inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$).

Figura 30. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-5 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-6 nas vias aéreas está mostrado na Figura 31. Houve um aumento nas células positivas para IL-6 nas vias aéreas no grupo OVA ($5,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,6 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($2,0 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,5 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-6 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com anti-IL17, inibidor de Rho-quinase ou a associação de inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença nos grupos OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados ao grupo controle SAL.

Figura 31. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-6 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares pode ser observado na Figura 32. Houve um aumento de células positivas IL-6 nos septos alveolares no grupo OVA ($3,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,9 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,3 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,3 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células IL-6 positivas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença nos grupos OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados ao grupo controle SAL.

Figura 32. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x

O número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas está mostrado na Figura 33. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para IL-10 no grupo OVA ($9,4 \pm 1,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos OVA - RHOi ($2,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($3,8 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,8 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-10 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos que receberam tratamentos. Não houve diferenças entre os grupos tratados quando comparados ao grupo controle SAL.

Figura 33. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares está mostrado na Figura 34. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para IL-10 no grupo OVA ($5,8 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,6 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($2,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($3,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($2,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-10 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 34. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas pode ser observado na Figura 35. Houve um aumento das células positivas nas vias aéreas para IL-13 no grupo OVA ($3,3 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,9 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos OVA - RHOi ($1,1 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($0,05 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,03 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou as células IL-13 positivas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com anti-IL17, inibidor de Rho-quinase ou a associação de inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 quando comparados ao grupo controle.

Figura 35. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-13 nos septos alveolares pode ser observado na Figura 36. Houve um aumento de células positivas IL-13 nos septos alveolares no grupo OVA ($4,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos: OVA - RHOi ($1,1 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($0,3 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,8 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou as células IL-13 positivas quando comparados ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle.

Figura 36. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-13 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas está mostrado na Figura 37. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para IL-17 no grupo OVA ($6,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,5 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos OVA-RHOi ($1,8 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($0,9 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,8 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-17 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve uma diminuição das células positivas para IL-17 nos grupos OVA - anti-IL17 e OVA-RHOi - anti-IL17 quando comparados com o grupo OVA - RHOi, ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com anti-IL17, ou a associação de inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 quando comparados ao grupo controle SAL.

Figura 37. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHOi, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares está mostrado na Figura 38. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para IL-17 no grupo OVA ($4,2 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,3 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($1,4 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,3 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,0 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para IL-17 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17, e OVA - RHOi - anti-IL17.

Figura 38. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

A avaliação por PCR para a expressão gênica de IL-17 no pulmão está mostrada na Figura 39. Houve um aumento no grupo OVA [$1,0 \pm 0,1$ level mRNA (UA)] comparativamente ao grupo controle SAL [$0,07 \pm 0,03$ level mRNA (UA)], ($p < 0,05$.) O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase [OVA - RHOi: $0,1 \pm 0,05$ level mRNA (UA)], tratamento com anti-IL17 [OVA - anti-IL17: $0,09 \pm 0,03$ level mRNA (UA)] e a associação dos dois tratamentos [OVA - RHOi - anti-IL17: $0,07 \pm 0,02$ level mRNA (UA)] atenuou a expressão de IL-17 quando comparados ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 39. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a expressão gênica de IL-17 * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

O número de células positivas para TNF- α nas vias aéreas está mostrado na Figura 40. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para TNF- α no grupo OVA ($6,1 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $1,5 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de TNF- α nas vias aéreas comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo tratado com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $3,2 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $3,8 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) não apresentaram diferença quando comparados ao grupo OVA.

Figura 40. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TNF α nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para TNF- α nos septos alveolares pode ser observado na Figura 41. Houve um aumento de células positivas nos septos alveolares para TNF- α no grupo OVA ($5,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($1,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com inibidor de Rho quinase: OVA - RHOi ($3,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17: OVA - anti-IL-17 ($1,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos: OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células TNF α positivas nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição de células positivas do grupo OVA - RHOi - anti-IL17 comparativamente aos grupos OVA - RHOi ($p < 0,05$). Não houve diferença do tratamento associado de anti-IL17 ao inibidor de Rho-quinase quando comparados ao grupo controle SAL.

Figura 41. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TNF α nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHOi, com aumento de 1000x.

A Tabela 2 demonstra todos os marcadores inflamatórios pesquisados em vias aéreas para facilitar visualização.

Tabela 2. Marcadores inflamatórios em vias aéreas

	Marcadores inflamatórios	SAL	OVA	OVA-RHOi	OVA-anti-IL17	OVA-RHOi-anti-IL17
Vias aéreas	CD4 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.08±0.08	7.17±1.18 *	4.27±0.93***	1.85 ±0.53**	2.41±0.59 **
Vias aéreas	CD8 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2.04±1.15	23.75±2.27 *	13.59±2.51 ***	8.72±3.21**	4.6±0.89 **, &
Vias aéreas	IL-1 β (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2.35±0.77	12.61±2.18 *	4.66±0.92 **	4.73±0.94 **	3.52±1.77 **
Vias aéreas	IL-2 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1.16±0.17	4.99±0.27 *	1.12±0.43 **	1.71±0.28 **	2.32±0.86 **
Vias aéreas	IL-4 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.43±0.31	4.11±1.31 *	2.02±0.65	1.3±0.63	1.19±0.44 **
Vias aéreas	IL-5 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.9±0.13	5.11±0.28 *	2.09±0.25 ***	1.59±0.22 **	0.63±0.12**, \$
Vias aéreas	IL-6 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.63±0.11	5.79±0.33 *	2.04±0.57 ***	1.52±0.14**	1.1±0.31 **
Vias aéreas	IL-10 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.46±0.36	9.44±1.99 *	2.32±0.72 **	3.84±1.01 **	1.83±0.61 **
Vias aéreas	IL-13 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.09±0.09	3.34±1.32*	1.13±0.42 **	0.05±0.05 **	1.03±0.41 **
Vias aéreas	IL-17 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.57±0.09	6.02±0.22 *	1.89±0.19 ***	0.96±0.14 **, &	0.84±0.13 **, &
Vias aéreas	TNF- α (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	2.04±0.33	6.15±0.64 *	3.26±1.34	3.82±0.73	1.58 ±0.29 **

*p <0,05 comparado ao grupo SAL; **p<0,05 comparado ao grupo OVA; \$p<0,05 comparado ao grupo OVA - RHOi e OVA - anti-IL17; &p<0,05 comparado ao grupo OVA – RHOi.

A Tabela 3 demonstra todos os marcadores inflamatórios pesquisados em septos alveolares para facilitar visualização.

Tabela 3. Marcadores inflamatórios em septos alveolares

	Marcadores inflamatórios	SAL	OVA	OVA-RHOi	OVA-anti-IL17	OVA-RHOi-anti-IL17
Septos alveolares	CD4 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.82±0.24	10.51±1.17 *	2.97±0.47 **	2.76±0.47 **	2.3±0.39 **
Septos alveolares	CD8 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.97±0.35	14.75±1.8 *	6.13±0.77 *,**	5.71±0.98 **	2.95±0.71 **
Septos alveolares	IL-1 β (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	11.8±1.37	20.25±1.34 *	10.79±0.85**	14.85±1.48 **	10.95±1.24 **
Septos alveolares	IL-2 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.928 ±0.085	3.212±0.106*	1.084±0.410**	1.069±0.117**	0.997±0.344**
Septos alveolares	IL-4 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.838±0.290	5.227±0.602*	2.970 ±0.494***, #	5.512±0.947*	1.482±0.295**, \$
Septos alveolares	IL-5 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.39±0.07	5.07±0.3 *	2.28±0.3 ***	1.97±0.25 *,**	0.81±0.163 **, \$
Septos alveolares	IL-6 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.915±0.116	3.979±0.224*	2.085±0.340*,**	1.33±0.16**	1.33±0.44**
Septos alveolares	IL-10 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.62±0.19	5.86±0.88 *	2.44±0.54 **	3.48±0.48 ***	2.22±0.36 **
Septos alveolares	IL-13 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.722±0.414	4.690±0.596*	1.150±0.253**	0.324±0.159**	0.853±0.199**
Septos alveolares	IL-17 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	0.32±0.05	4.28±0.18 *	1.4±0.14 ***	1.3±0.39 *,**	1.09±0.12 ***
Septos alveolares	TNF- α (células/ $10^4\mu\text{m}^2$)	1.182 ±0.376	5.438±0.543*	3.401 ±0.531*,**	1.364±0.278**, &	1.056±0.246**, &

*p <0,05 comparado ao grupo SAL; **p<0,05 comparado ao grupo OVA; \$p<0,05 comparado ao grupo OVA - RHOi e OVA - anti-IL17; #p<0,05 comparado ao grupo OVA - anti-il17; &p<0,05 comparado ao grupo OVA – RHOi.

5.3 Remodelamento

O conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas está mostrado na Figura 42. Houve um aumento de fibras colágenas nas vias aéreas no grupo OVA ($16,4 \pm 0,7\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($5,7 \pm 0,7\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $3,7 \pm 0,4\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $3,4 \pm 0,6\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $5,8 \pm 0,4\%$) atenuou o conteúdo de fibras colágenas quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com o grupo controle SAL.

Figura 42. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de fibras colágenas nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

O conteúdo de fibras colágenas nos septos alveolares está mostrado na Figura 43. Houve aumento de fibras colágenas nos septos alveolares no grupo OVA ($12,4 \pm 0,7\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($6,8 \pm 0,5\%$), ($p < 0,05$.) O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $6,0 \pm 0,3\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $4,3 \pm 0,2\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $7,06 \pm 0,3\%$) atenuou as fibras colágenas quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição de fibras colágenas nos septos alveolares no grupo OVA - anti-IL17 quando comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 ($p < 0,05$).

Figura 43. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de fibras colágenas nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - anti-IL17.

O conteúdo de fibronectina nas vias aéreas está mostrado na Figura 44. Houve um aumento no conteúdo de fibronectina nas vias aéreas no grupo OVA ($1,0 \pm 0,1\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,4 \pm 0,08\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,2 \pm 0,04\%$), e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,2 \pm 0,05\%$) atenuou o conteúdo de fibras colágenas quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença do grupo OVA - anti-IL17 ($0,9 \pm 0,2\%$) comparativamente ao grupo OVA. Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL. Houve atenuação do conteúdo de fibronectina nos grupos OVA-RHOi e OVA-RHOi-anti-IL17 comparativamente ao grupo OVA-anti-IL17 ($p < 0,05$).

Figura 44. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de fibronectina nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - anti-IL17.

O conteúdo de fibronectina nos septos alveolares está mostrado na Figura 45. Houve aumento do conteúdo de fibronectina nos septos alveolares no grupo OVA ($3,0 \pm 0,2\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($1,3 \pm 0,09\%$), ($p < 0,05$.) O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,2 \pm 0,04\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $1,2 \pm 0,2\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,5 \pm 0,07\%$) atenuou o conteúdo de fibronectina comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve atenuação do conteúdo de fibronectina nos grupos OVA-RHOi comparativamente ao grupo OVA-anti-IL17 ($p < 0,05$).

Figura 45. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de fibronectina nos septos alveolares * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - anti-IL17.

O conteúdo de decorina nas vias aéreas está mostrado na Figura 46. Houve um aumento no conteúdo de decorina nas vias aéreas no grupo OVA ($5,5 \pm 2,5\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,4 \pm 0,1\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,5 \pm 0,1\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $1,5 \pm 0,3\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $1,5 \pm 0,2\%$) atenuou o conteúdo de decorina comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos tratados comparativamente ao grupo controle SAL.

Figura 46. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento do conteúdo de decorina nas vias aéreas * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

O conteúdo de decorina nos septos alveolares está mostrado na Figura 47. Houve um aumento no conteúdo de decorina no grupo OVA ($13,8 \pm 1,0\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($5,5 \pm 0,7\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $5,2 \pm 0,5\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $4,0 \pm 0,3\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $5,0 \pm 0,5\%$) atenuou o conteúdo de decorina comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com o grupo controle SAL.

Figura 47. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento do conteúdo de decorina nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

O conteúdo de biglicano nas vias aéreas está mostrado na Figura 48. Houve um aumento no conteúdo de biglicano nas vias aéreas no grupo OVA ($1,3 \pm 0,09\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,4 \pm 0,09\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,2 \pm 0,05\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $0,6 \pm 0,1\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,7 \pm 0,09\%$) atenuou o conteúdo de biglicano comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve atenuação do conteúdo de biglicano no grupo OVA-RHOi comparativamente ao grupo OVA-anti-IL17 e OVA-RHOi-anti-IL17 ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com o grupo controle SAL.

Figura 48. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de biglicano nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHOi.

O conteúdo de biglicano nos septos alveolares está mostrado na Figura 49. Houve um aumento no conteúdo de biglicano nos septos alveolares no grupo OVA ($3,6 \pm 0,2\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($1,2 \pm 0,1\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,1 \pm 0,05\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $1,5 \pm 0,1\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $3,0 \pm 0,2\%$) atenuou o conteúdo de biglicano comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo OVA-RHOi comparativamente ao grupo controle SAL. Houve atenuação do conteúdo de biglicano no grupo OVA-RHOi comparativamente ao grupo OVA-anti-IL17 e OVA-RHOi-anti-IL17 ($p < 0,05$).

Figura 49. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de biglicano nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHOi.

O número de células positivas para TGF- β nas vias aéreas está mostrado na Figura 50. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para TGF- β no grupo OVA ($12,0 \pm 2,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,5 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $4,1 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $2,8 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $0,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de TGF- β nas vias aéreas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 50. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares está mostrado na Figura 51. Houve um aumento no número de células positivas nos septos alveolares para TGF- β no grupo OVA ($14,5 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($3,8 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $11,1 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $7,9 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $2,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de TGF- β nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos septos alveolares a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou a expressão de células positivas para TGF- β quando comparado ao grupo tratado apenas com anti-IL17 ou inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$). Não houve diferença entre o grupo OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 51. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHO - anti-IL17, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas está mostrado na Figura 52. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para MMP-9 no grupo OVA ($7,2 \pm 1,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,4 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $3,4 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $2,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $1,3 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de MMP-9 nas vias aéreas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 52. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares pode ser observado na Figura 53. Houve um aumento de células positivas nos septos alveolares para MMP-9 no grupo OVA ($19,7 \pm 2,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($11,4 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com inibidor de Rho quinase: OVA - RHOi ($13,6 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17: OVA - anti-IL-17 ($8,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos: OVA - RHOi - anti-IL17 ($11,2 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas MMP-9 nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição de células positivas do grupo OVA - anti-IL17 comparativamente ao grupo OVA - RHOi ($p < 0,05$). Não houve diferença dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle SAL.

Figura 53. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHOi, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas está mostrado na Figura 54. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para MMP-12 no grupo OVA ($9,7 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $0,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $2,0 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $2,3 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de MMP-12 nas vias aéreas ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 54. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares pode ser observado na Figura 55. Houve um aumento de células positivas nos septos alveolares para MMP-12 no grupo OVA ($7,3 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com inibidor de Rho quinase: OVA - RHOi ($4,7 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17: OVA - anti-IL17 ($4,1 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos: OVA - RHOi - anti-IL17 ($2,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas MMP-12 nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença dos grupos que receberam tratamento com o grupo controle SAL.

Figura 55. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas está mostrado na Figura 56. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para TIMP-1 no grupo OVA ($6,1 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,2 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $1,5 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $2,9 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $1,6 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de TIMP-1 nas vias aéreas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 56. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas TIMP-1 nos septos alveolares pode ser observado na Figura 57. Houve um aumento de células positivas nos septos alveolares para TIMP-1 no grupo OVA ($8,7 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,8 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com inibidor de Rho quinase: OVA - RHOi ($5,6 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17: OVA - anti-IL17 ($4,9 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos: OVA - RHOi - anti-IL17 ($4,7 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas TIMP-1 nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 57. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

A Tabela 4 demonstra os dados referentes aos marcadores de remodelamento em vias aéreas para facilitar visualização.

Tabela 4. Marcadores de remodelamento em vias aéreas

	Marcadores de remodelamento	SAL	OVA	OVA - RHOi	OVA - anti-IL17	OVA - RHOi - anti-IL17
Vias aéreas	Fibras colágenas (%)	5.78±0.73	16.48±0.78 *	3.72±0.44 **	3.45±0.66 **	5.82±0.48 **
Vias aéreas	Fibronectina (%)	0.45±0.08	1.0±0.18 *	0.21±0.04 **, #	0.98±0.23 *	0.28±0.05 **, #
Vias aéreas	Decorina (%)	0.41±0.12	5.53±2.53 *	0.58±0.19 **	1.54±0.31 **	1.55±0.23 **
Vias aéreas	Biglicano (%)	0.48±0.09	1.32±0.09 *	0.22±0.05 **	0.6±0.11 **, &	0.75±0.09 **, &
Vias aéreas	TGF-β (células/10 ⁴ μm ²)	2.52±0.91	12.01±2.28 *	4.18±1.06 **	2.84±0.84 **	0.84±0.41 **
Vias aéreas	MMP-9 (células/10 ⁴ μm ²)	2.4±0.75	7.25±1.79 *	3.49±0.82 **	2.36±0.72 **	1.37±0.46 **
Vias aéreas	MMP-12 (células/10 ⁴ μm ²)	0.51±0.35	9.78±0.81 *	0.51±0.3 **	2.08±0.84 **	2.35±0.88 **
Vias aéreas	TIMP-1 (células/10 ⁴ μm ²)	0.21±0.21	6.11±1.24 *	1.57±0.44 **	2.94±1.01 **	1.66±0.72 **

*p <0,05 comparado ao grupo SAL; **p<0,05 comparado ao grupo OVA; #p<0,05 comparado ao grupo OVA - anti-il17; & p<0,05 comparado ao grupo OVA - RHOi.

A Tabela 5 demonstra os dados referentes aos marcadores de remodelamento em vias aéreas para facilitar visualização.

Tabela 5. Marcadores de remodelamento em septos alveolares

	Marcadores de remodelamento	SAL	OVA	OVA - RHOi	OVA - anti-IL17	OVA - RHOi - anti-IL17
Septos alveolares	Fibras colágenas (%)	6.89±0.5	12.43±0.7 *	6.08±0.35 **, #	4.39±0.29 ***,	7.06±0.38 **, #
Septos alveolares	Fibronectina (%)	1.38±0.09	3.02±1.29 *	0.28±0.04 **, #	1.23±0.26 **	0.56±0.07 **,
Septos alveolares	Decorina (%)	5.57 ±0.7	13.81±1.05 *	5.28±0.57 **	4.03±0.38 **	5.06±0.5 **
Septos alveolares	Biglicano (%)	1.2±0.11	3.64±0.29 *	0.18 ±0.05 **,	1.54±0.15 **, &	3.0±0.26 **, &
Septos alveolares	TGF-β (células/10 ⁴ μm ²)	3.8±0.7	14.59±1.7*	11.16±0.96 **,	7.95±1.0 **,	2.62±0.48 **, \$
Septos alveolares	MMP-9 (células/10 ⁴ μm ²)	11.4±1.25	19.78±2.01 *	13.68±1.08 **	8.3±0.7 **, &	11.28±0.8 **
Septos alveolares	MMP-12 (células/10 ⁴ μm ²)	2.62±0.55	7.39±1.08 *	4.7±0.71 **	4.16±0.6 **	2.83±0.43 **
Septos alveolares	TIMP-1 (células/10 ⁴ μm ²)	0.83±0.2	8.72±0.85 *	5.65±0.61 **,	4.95±0.61 **,	4.75±0.72 **,

*p <0,05 comparado ao grupo SAL; **p<0,05 comparado ao grupo OVA; \$ p<0,05 comparado ao grupo OVA - RHOi e OVA - anti-IL17; #p<0,05 comparado ao grupo OVA - anti-IL17; & p<0,05 comparado ao grupo OVA - RHOi.

5.4 Estresse Oxidativo

O número de células positivas para iNOS nas vias aéreas está mostrado na Figura 58. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para iNOS no grupo OVA ($13,0 \pm 2,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($4,0 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $3,2 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $4,8 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $5,4 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de iNOS nas vias aéreas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 58. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para iNOS nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas iNOS nos septos alveolares pode ser observado na Figura 59. Houve um aumento de células positivas nos septos alveolares para iNOS no grupo OVA ($16,3 \pm 1,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($6,8 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com inibidor de Rho quinase: OVA - RHOi ($11,0 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17: OVA - anti-IL17 ($7,6 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos: OVA - RHOi - anti-IL17 ($8,3 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas iNOS nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 59. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para iNOS nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O conteúdo de isoprostano PGF-2 α nas vias aéreas está mostrado Figura 60. Houve um aumento da porcentagem de isoprostano PGF-2 α em vias aéreas no grupo OVA ($25,1 \pm 2,5\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,3 \pm 0,6\%$), ($p < 0,05$.) O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $2,9 \pm 0,3\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $2,7 \pm 0,4\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $5,2 \pm 1,3\%$) atenuou o conteúdo de isoprostano PGF-2 α quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos tratados com o grupo controle SAL.

Figura 60. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de isoprostano nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

O conteúdo de isoprostano PGF-2 α nos septos alveolares está mostrado na Figura 61. Houve um aumento de isoprostano PGF-2 α nos septos alveolares no grupo OVA ($16,8 \pm 0,6\%$) comparativamente ao grupo controle SAL ($4,0 \pm 0,3\%$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $10,8 \pm 0,5\%$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $7,5 \pm 0,4\%$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $10,0 \pm 0,3\%$) atenuou a porcentagem de isoprostano PGF-2 α quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição de isoprostano PGF-2 α nos septos alveolares no grupo OVA - anti-IL17 quando comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 ($p < 0,05$).

Figura 61. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para % de aumento de isoprostano nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - anti-IL17.

Na Figura 62 está mostrado o painel de fotos para facilitar visualização de vias aéreas nos grupos SAL, OVA, OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17.

Figura 62. Fotomicrografia de vias aéreas para IL-5, IL-13, IL-17, ROCK1, ROCK2, MMP-9, TIMP-1, iNOS e isoprostano nos grupos SAL, OVA, OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17, com aumento de 1000x, escala de 10µm. Célula positiva identificada pela seta vermelha.

Na Figura 63 está mostrado o painel de fotos para facilitar visualização de vias aéreas nos grupos SAL, OVA, OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17.

Figura 63. Fotomicrografia de sepros alveolares para IL-5, IL-13, IL-17, ROCK1, ROCK2, MMP-9, TIMP-1, iNOS e isoprostano nos grupos SAL, OVA, OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17, com aumento de 1000x, escala de 10µm. Célula positiva identificada pela seta vermelha.

5.5 Vias sinalizadoras

O número de células positivas para células dendríticas nas vias aéreas pode ser observado na Figura 64. Houve um aumento do número de células positivas para células dendríticas nas vias aéreas dos animais do grupo OVA ($10,5 \pm 2,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo controle (SAL: $0,3 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O número de células positivas no grupo OVA - RHOi ($1,8 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($3,2 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 64. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para células dendríticas nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para células dendríticas nos septos alveolares podem ser observadas na Figura 65. Houve um aumento de células positivas para células dendríticas nos septos alveolares dos animais do grupo OVA ($8,4 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo controle SAL ($1,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O número de células positivas no grupo OVA - RHOi ($2,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($1,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,6 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos septos alveolares a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou a expressão de células positivas para células dendríticas quando comparado ao grupo tratado apenas com o inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$).

Figura 65. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para células dendríticas nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA - RHOi, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para NF-kappaB nas vias aéreas está mostrado na Figura 66. Houve um aumento no número de células positivas nas vias aéreas para NF-kappaB no grupo OVA ($6,6 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($3,1 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase (OVA - RHOi: $3,4 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17 (OVA - anti-IL17: $3,0 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos (OVA - RHOi - anti-IL17: $1,5 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas de NF-kappaB nas vias aéreas comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 66. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NF-kappaB nas vias aéreas: * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas NF-kappaB nos septos alveolares pode ser observado na Figura 67. Houve um aumento de células positivas nos septos alveolares para NF-kappaB no grupo OVA ($23,8 \pm 2,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($12,9 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais com inibidor de Rho quinase: OVA - RHOi ($12,1 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com anti-IL17: OVA - anti-IL17 ($7,5 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e a associação dos dois tratamentos: OVA - RHOi - anti-IL17 ($11,4 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas NF-kappaB nos septos alveolares comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Os grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 não apresentaram diferença com o grupo SAL.

Figura 67. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para iNOS nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para FOXP3 nas vias aéreas está mostrado na Figura 68. Houve um aumento de células positivas nas vias aéreas para FOXP3 no grupo OVA ($7,2 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($0,2 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ($p < 0,05$). O tratamento dos animais nos grupos OVA - RHOi ($2,2 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($3,7 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - RHOi - anti-IL17 ($0,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para FOXP3 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença dos grupos OVA - RHOi e OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparados com o grupo controle SAL.

Figura 68. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para FOXP3 nas vias aéreas. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, com aumento de 1000x.

O número de células positivas para FOXP3 nos septos alveolares está mostrado na Figura 69. Houve um aumento nas células positivas nos septos alveolares para FOXP3 no grupo OVA ($7,7 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo controle SAL ($2,2 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento dos animais nos grupos, OVA - RHOi ($4,0 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA - anti-IL17 ($4,4 \pm 0,5$) e OVA - RHOi - anti-IL17 ($1,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou o número de células positivas para FOXP3 comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos septos alveolares a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17 atenuou a expressão de células positivas para FOXP3 quando comparado ao grupo tratado apenas com anti-IL17 ou inibidor de Rho-quinase ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre o grupo OVA - RHOi - anti-IL17 e o grupo controle SAL.

Figura 69. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para FOXP3 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA - RHOi e OVA - anti-IL17, com aumento de 1000x.

5.6 Mecanismos envolvidos na resposta inflamatória

A avaliação por PCR para a expressão gênica de VACHT no pulmão está mostrada na Figura 70. Houve um aumento no grupo OVA [$15,5 \pm 1,1$ level mRNA (UA)] comparativamente ao grupo controle SAL [$1,2 \pm 0,7$ level mRNA (UA)], ($p < 0,05$.) O tratamento dos animais com inibidor de Rho-quinase [OVA - RHOi: $8,6 \pm 2,0$ level mRNA (UA)], tratamento com anti-IL17 [OVA - anti-IL17: $6,6 \pm 0,6$ level mRNA (UA)] e a associação dos dois tratamentos [OVA - RHOi - anti-IL17: $7,2 \pm 1,5$ level mRNA (UA)] atenuou a expressão de VACHT quando comparados ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 70. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a expressão gênica de VACHT. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A avaliação por PCR da expressão gênica de arginase no pulmão está mostrada na Figura 71. Houve um aumento no grupo OVA [$3,6 \pm 0,4$ level mRNA (UA)] comparativamente ao grupo controle SAL [$(0,8 \pm 0,3$ level mRNA (UA)], ($p < 0,05$.) O tratamento dos animais inibidor de Rho-quinase [(OVA - RHOi: $1,6 \pm 0,2$ level mRNA (UA)], com anti-IL17 [(OVA - anti-IL17: $1,6 \pm 0,2$ level mRNA (UA)] e a associação dos dois tratamentos [OVA - RHOi - anti-IL17: $0,9 \pm 0,2$ level mRNA (UA)] atenuou a expressão de arginase quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 e OVA - RHOi - anti-IL17 com o grupo controle SAL.

Figura 71. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a expressão gênica de arginase no pulmão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que nos animais tratados isoladamente com anticorpo IL-17 ou a inibição da Rho-quinase por intermédio do inibidor Y-27632 comparativamente aos sensibilizados e não tratados houve atenuação no fluido do lavado brocoalveolar da quantidade de células totais, eosinófilos e macrófagos. Houve redução do número de células positivas para CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas, FOXP3, NF-kappaB, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, IL-6, IL-13, ROCK1, ROCK2 e TNF α . Notamos redução da expressão gênica de VACHT e arginase. Quanto ao conteúdo de isoprostano PGF-2 α , fibronectina, decorina, biglicano e de fibras colágenas também houve redução. Houve também nesses grupos tratados controle da hiperresponsividade à metacolina tanto da resistência quanto da elastância do sistema respiratório.

Quando os tratamentos foram associados houve potencialização do controle da resposta de hiperresponsividade à metacolina da resistência e elastância do sistema respiratório. Em vias aéreas houve potencialização da redução do número de células IL-5 positivas e nos septos alveolares de células CD8⁺, IL-4, IL-5, TGF- β , FOXP3, ROCK1 e ROCK2 positivas.

A inibição da Rho-quinase ou o tratamento com anti-IL17 atenuou as respostas máximas de resistência e elastância teciduais pós-desafio com metacolina comparativamente aos animais sensibilizados e não tratados, e esta atenuação foi mais significativa quando os tratamentos foram associados. Schaafsma et al. (2008) verificaram os efeitos do pré-tratamento com o inibidor

da Rho-quinase (Y-27632) na diminuição das respostas aguda e tardia induzida por alérgeno (ovoalbumina). Schaafsma et al. (2004) também mostraram uma proteção contra o desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas, sugerindo um efeito de relaxamento deste inibidor. Concluíram que a inibição de Rho-quinase a longo prazo pode ser benéfica para o tratamento de doenças das vias aéreas. Além disso, os estudos indicam que a Rho-quinase pode estar envolvida na resposta da hiperreatividade das vias aéreas, tendo em vista a observação de que o aumento resultante da administração de histamina e PGF-2 α é revertido na presença de Y-27632. Em estudo de Righetti et al. (2014) a inibição da Rho-quinase nos animais expostos cronicamente à ovoalbumina atenuou a hiperresponsividade do parênquima distal.

Witzenrath et al. (2008) verificaram que o uso de Y-27632 em camundongos sensibilizados com ovoalbumina foi capaz de atenuar a contratilidade das vias aéreas provocada por metacolina em animais sensibilizados. Possa et al. (2012) demonstraram também, em modelo de asma com inflamação alérgica crônica, que a hiperresponsividade ao desafio com antígeno foi reduzida pela inibição da Rho-quinase nos animais sensibilizados. Pigati et al. (2015) demonstraram que o tratamento de animais com o inibidor da Rho-quinase ou tratamento com corticosteróide atenuou a resposta máxima à ovoalbumina de resistência de vias aéreas em relação ao grupo sensibilizado e não tratado. Porém, não houve potencialização dessa resposta no grupo que recebeu a associação dos dois tratamentos.

Taki et al. (2007) utilizaram o inibidor de Rho-quinase (fasudil) e demonstraram que o tratamento suprimiu a hiperresponsividade à metacolina induzida por desafios de ovoalbumina.

Kudo et al. (2012) relataram em um estudo *in vitro* com camundongos que a IL-17 pode atenuar a resposta contrátil de músculo liso em vias aéreas. Manni et al. (2016) demonstraram que IL-17A contribui de forma independente para a hiperresponsividade das vias aéreas, em um modelo experimental de asma misto de Th2 / Th17 resistente a esteróides.

Contudo, não há trabalhos que avaliaram os efeitos da associação dos dois tratamentos na hiperresponsividade brônquica.

Estudos reforçam que o sistema RhoA / ROCK desempenha um papel no recrutamento de eosinófilos e na secreção de citocinas Th-1 e Th-2. As ROCKs estão envolvidas em diversas atividades celulares, como: organização do citoesqueleto, adesão celular e motilidade, proliferação e apoptose, remodelamento da matriz extracelular e a contração da musculatura lisa (Hartmann, Ridley e Lutz, 2015). Existem duas isoformas, ROCK1 e ROCK2. O papel funcional de ROCK1 e ROCK2 semelhante em processos como fosforilação da cadeia leve de miosina induzida por TNF- α (Mong e Wang, 2009).

No presente estudo o número de células positivas para ROCK1 foi maior no grupo OVA tanto em vias aéreas quanto em septos alveolares quando comparado ao grupo controle. Os tratamentos com inibidor de Rho-quinase ou com anti-IL17 atenuaram o número de células positivas ROCK1 em relação ao grupo apenas sensibilizado. Houve potencialização do controle dessa resposta

nos septos alveolares no grupo em que o tratamento com inibidor de Rho-quinase foi associado ao tratamento com anti-IL17. Estes dados reforçam a efetividade do tratamento com o inibidor de Rho-quinase no modelo, que não apenas bloqueia a ação de Rho-quinase 1 como também reduz a expressão da própria enzima. Como há um papel significativo dessa via no controle da contração muscular, consideramos que parte dos resultados observados na avaliação da hiperresponsividade dependeram do bloqueio das ROCKs pelos tratamentos instituídos.

Em relação à infiltração eosinofílica, os tratamentos com o inibidor da Rho-quinase, o anti-IL17 ou a associação dos dois foi capaz de atenuar esta resposta nos animais sensibilizados. Nos três grupos de tratamento não houve diferenças nos valores de eosinófilos comparativamente ao grupo controle salina.

Adachi et al. (2001) avaliaram os eosinófilos isolados sangue periférico de humanos após a administração do inibidor da Rho-quinase (Y-27632) e demonstraram que o uso deste inibidor reduz a eosinofilia em decorrência da diminuição da sinalização pela eotaxina. Henry et al. (2005) também demonstraram que o pré-tratamento com Y-27632 reduziu o número de eosinófilos no fluído lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados com ovoalbumina.

Taki et al. (2007), utilizando o inibidor de Rho-quinase (fasudil) administrado a camundongos desafiados com ovoalbumina observaram que o número aumentado de células de células totais e eosinófilos foi atenuado no fluído do lavado broncoalveolar, nas vias aéreas e nos vasos sanguíneos. A

análise histológica das vias aéreas revelou que tanto a infiltração de células inflamatórias como a hiperplasia de células caliciformes foram atenuadas nos animais tratados com fasudil. Possa et al. (2012) também demonstraram que o inibidor de Rho-quinase reduziu o número de eosinófilos em vias aéreas em modelo de asma tratado com Y-27632.

No parênquima pulmonar distal de cobaias com inflamação alérgica crônica, Pigati et al. (2015) demonstraram atenuação do número de eosinófilos com o tratamento com Y-27632 associado ou não ao corticosteróide. Em modelos experimentais de asma com deficiência da IL-17A houve uma redução do número de neutrófilos, e de eosinófilos em vias aéreas (Schnyder-Candrian S et al. 2006; Wakashin et al. 2008). Em outros estudos, a neutralização do IL-17A aumentou a inflamação eosinofílica (Hellings et al. 2003; Schnyder-Candrian et.al. 2006).

Resultados do estudo presente estão de acordo com estudos anteriores, sugerindo que o tratamento com anti-IL17A é capaz de inibir a inflamação eosinofílica (Song C et al. 2008; Lajoie S et al. 2010; Willis et al. 2015). Os dados reforçam que as células de perfil Th17 podem colaborar com o aumento da inflamação eosinofílica mediadas por Th2.

Novamente não encontramos na literatura estudos com a associação do inibidor de Rho-quinase e anti-IL17 em modelos experimentais de asma avaliando a resposta eosinofílica.

No presente estudo, o número de células positivas para CD8⁺ e CD4⁺ foi maior no grupo OVA quando comparado ao grupo controle. Miyahara et al.

(2004) utilizaram um modelo de asma com camundongos C57BL/6 e demonstraram que camundongos deficientes em CD8⁺ tem atenuação de hiperresponsividade, inflamação eosinofílica e IL-13 no fluido do lavado broncoalveolar em comparação com os animais controle. Estes dados sugerem um papel importante para as células T CD8⁺ efetoras no desenvolvimento de hiperresponsividade de vias aéreas e inflamação das vias aéreas.

No presente estudo, os grupos tratados isoladamente com inibidor de Rho-quinase ou com anti-IL17 apresentaram diminuição de células CD4⁺ e CD8⁺ positivas. Essa resposta foi potencializada quando os tratamentos foram associados. Este efeito foi observado nas vias aéreas e septos alveolares para células positivas CD8⁺ e em septos alveolares para as células CD4⁺ positivas. Cabe ainda ressaltar que quando os tratamentos foram associados, o número de células positivas para CD8⁺ não apresentou diferença quando comparado ao grupo controle salina.

Schaller et al. (2005) estudando o papel do inibidor das células CD8⁺ em camundongos sensibilizados demonstraram que houve diminuição da hiperresponsividade e das citocinas IL-2, IL-5 e IL-13. Esses dados indicam que as células CD8⁺ também desempenham um papel importante na exarcebação das respostas alérgicas através da modulação da produção de citocinas IL-4 e IL-13. Em modelo experimental de asma, Wang e Wills-karp (2011) demonstram que as células CD4⁺/Th2 positivas induziram a inflamação e durante a fase crônica há produção de IL-17.

Células dendríticas (DC), estão localizadas nas barreiras epiteliais, onde são expostas a estímulos de patógenos ou alérgenos. As células imunitárias inatas também tem contato com antígeno nestes locais, que apresentam às células T para iniciar as respostas das células T helper 2 (TH2). A IL-13 também pode promover a migração de DCs para os gânglios linfáticos para estimular a ativação adicional de células TH2, auxiliada pelo fornecimento de IL-4 por outras células hematopoiéticas, como os basófilos (Walker e McKenzie, 2018). Foi observado neste estudo atenuação de células dendríticas em vias aérea e septos alveolares nos grupos tratados OVA - RHOi, OVA - anti-IL17 OVA - RHOi - anti-IL17 quando comparado ao grupo OVA, acreditando que esta resposta esteja envolvida no controle da asma em células TH2. Camargo et al. (2018) demonstraram atenuação do número de células positivas para células dendríticas em animais expostos à ovoalbumina e exacerbados com LPS quando receberam tratamento com anti-IL17.

Em um estudo recente foi descrito uma maior expressão de FOXP3 em pacientes com asma alérgica do que a asma não alérgica e a capacidade supressora de células Treg foi observada em ambos os grupos (Raedler et al., 2015). Camargo et al., 2018 demonstraram em um modelo experimental de inflamação alérgica crônica atenuação da expressão de FOXP3 em animais expostos a ovalbumina e tratados com anti-IL17. Em nosso estudo, mostramos um aumento na expressão de FOXP3 no grupo OVA comparado ao grupo SAL, e uma atenuação nos grupos tratados com o anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase. Sua atenuação foi potencializada nos septos alveolares quando os dois tratamentos foram associados.

Em relação ao número de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 e TNF α houve atenuação nos grupos tratados isoladamente com inibidor de Rho-quinase ou anti-IL17 comparativamente ao grupo sensibilizado e não tratado. Houve potencialização de resposta com a associação dos tratamentos em relação às células positivas IL-5 em vias aéreas e IL-4 e IL5 em septos alveolares.

Modelos animais e estudos clínicos em seres humanos indicam um papel importante para as células Th2 que produzem IL-4, IL-5 e IL-13 na patogênese da asma alérgica (Yssel e Groux, 2000).

Possa et al. (2012) demonstraram que os animais expostos à ovoalbumina que receberam o tratamento com o inibidor de Rho-quinase apresentaram redução de células positivas para IL-13 em vias aéreas em comparação com o grupo apenas sensibilizado. Pigati et al. (2015) verificaram um aumento no número de células positivas para IL-5 e IL-13 nas vias aéreas e no tecido pulmonar do grupo sensibilizado com ovoalbumina em comparação com o grupo controle e o grupo tratado com inibidor de Rho-quinase teve redução de células positivas para IL-5 e IL-13 nas vias aéreas e no tecido pulmonar em comparação com o grupo não tratado. Oeser et al., 2015 ao comparar camundongos do tipo selvagem com camundongos que não possuem IL-4 / IL-13 apenas em células T ou em todos os tipos de células, mostraram que todos os principais parâmetros da inflamação pulmonar alérgica (recrutamento de células efectoras, hiperplasia de células caliciformes, AHR) eram de fato dependentes de IL-4 / IL-13 derivada de células T.

Além disso, Kasahara et al. (2017) realizaram um estudo de inflamação alérgica com camundongos ROCK2 haploinsuficiente (Rock2 +/-), ou seja camundongos com deleção heterozigótica do alelo ROCK que se desenvolvem normalmente e apresentam metade dos níveis de proteína de ROCK2 já que camundongos knockout ROCK2-homozigotos (Rock2 -/-) morrem embrionariamente devido à disfunção placentária e retardo de crescimento intra-uterino. Nesse estudo os autores demonstraram que os camundongos ROCK+/- apresentaram respostas inflamatórias atenuadas ao alérgeno: linfócitos BAL, IL-5, IL-13, eosinófilos e eotaxina. Os dados desses autores também indicam que as células Th17 são mais dependentes de ROCK2 do que outras células CD4⁺ (Th1 e Th2). Isto pode ocorrer, pois o ROCK2 fosforila o fator regulador de interferon (IRF4), um fator de transcrição necessário para a produção de IL-17 e necessário para a indução de células Th17 (Biswas et al., 2010).

Através da ativação do receptor IL-17, a produção de IL-1, IL-6, IL-8, metaloproteinases e TNF- α pode ser induzida. A IL-6 em si é um fator de diferenciação para as células Th-17 e, portanto, é uma via realimentação positiva (Miossec, 2009). Além disso, foi demonstrado que a IL-17 ativa fibroblastos brônquicos levando a uma expressão de outras citocinas tais como IL-6 e IL-11 (Molet et.al, 2011).

Evidências demonstram que o TNF- α desempenha um papel crítico na iniciação e aumento da inflamação das vias aéreas em pacientes com asma (Berry et al., 2007 e Brown et al., 2015). Em um modelo experimental com animais com inflamação pulmonar alérgica, Kim et al. (2006) demonstraram que o TNF- α foi secretado nas vias aéreas dentro de 2 horas após a exposição à

poeira doméstica, a qual continha tanto alérgeno de baratas como endotoxina. Numa forma autócrina, o TNF- α secretado por mastócitos aumenta a ativação de mastócitos (Coward, et al., 2002). Neste presente estudo foi demonstrado que os tratamentos isolados com inibidor de Rho-quinase ou com o anti-IL17 atenuaram o número de células positivas para TNF- α tanto na via aérea quanto nos septos alveolares quando comparados ao grupo apenas sensibilizado e não tratado. Quando os tratamentos foram associados houve uma potencialização da atenuação do número de células positivas em vias aéreas quando comparados aos grupos tratados de forma individual.

O TNF- α induz eventos de sinalização complexos em células endoteliais (ECs), levando à transcrição de genes inflamatórios. Mong et al. (2007) examinaram a ativação de RhoA e Rho-quinase induzida por TNF- α em ECs na microvasculatura pulmonar de humanos e seu papel na regulação das respostas da ECs ao TNF- α . Sugerem que a Rho-quinase desempenha um papel importante nas respostas endoteliais ao TNF- α por aumento da produção de IL-6. Em tratamento de artrite reumatoide, TNF α e IL-17 apresentaram efeitos sinérgicos na promoção da produção de IL-6, IL-8 (Fischer et al., 2014).

Novamente, não encontramos estudos avaliando a associação dos tratamentos na expressão dessas citocinas.

Avaliando o remodelamento da matriz extracelular observamos que o conteúdo de fibras colágenas foi maior no grupo OVA tanto em vias aéreas quanto em septos alveolares quando comparado ao grupo controle.

Os dois tratamentos isolados e a associação dos mesmos atenuaram a resposta em relação ao grupo sensibilizado e não tratado. Cabe notar que o tratamento mais efetivo foi observado no grupo OVA-anti-IL17. Possa et al. (2012) mostraram também que o tratamento de animais expostos à ovoalbumina com o inibidor de Rho-quinase reduziu o conteúdo de fibras colágenas. Os mesmos resultados foram encontrados por Pigati et al. (2015) que observaram em modelo de asma experimental que os grupos tratados com inibidor de Rho-quinase, com corticóide ou ambos associados apresentaram redução do conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas e no tecido pulmonar comparativamente ao grupo apenas exposto à ovoalbumina.

Peters et al. (2016) demonstraram que a estimulação *in vitro* de fibroblastos de camundongos com IL-17A resultou no aumento a liberação de TGF- β e produção de fibras colágenas. Não há trabalhos *in vivo* avaliando fibras colágenas em vias aéreas e septos alveolares em modelos de asma tratados com anti-IL17.

Não encontramos estudos avaliando a resposta da associação dos tratamentos no conteúdo de fibras colágenas.

Em relação ao conteúdo de fibronectina, decorina e biglicano demonstramos que a porcentagem de aumento foi maior no grupo OVA tanto em vias aéreas quanto em septos alveolares quando comparado ao grupo controle SAL. E os grupos tratados apresentaram atenuação do conteúdo de fibronectina, decorina e biglicano quando comparados ao grupo OVA. Estudos confirmam nossos resultados, demonstrando atenuação do conteúdo destes marcadores de

remodelamento quando animais expostos à ovoalbumina receberam tratamento com anti-IL17 (Camargo et al., 2018). Em relação a ROCK é possível que a sinalização Rho / ROCK esteja diretamente envolvida nos processos profibróticos, mediados por células residentes nas vias aéreas. As interações entre integrantes do citoesqueleto têm se mostrado necessárias para a montagem da MEC e mediadas pela família Rho das GTPases, especificamente Rho (Steward et al., 2011). Zhu et al. (2013) analisaram o papel do Y27632, na mediação da produção de componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, MMP-2 e colágeno tipo I induzida por fator de crescimento tecidual (CTGF) ou fator de crescimento transformante - β (TGF- β) em uma linhagem celular epitelial pigmentar da retina humana. Demonstraram que o TGF- β regula positivamente a expressão dos componentes da MEC, incluindo fibronectina, laminina, MMP-2 e colágeno tipo I, ativando a via de sinalização RhoA / ROCK. Y27632 inibiu a transcrição de fibronectina, MMP-2 e colágeno tipo I.

Biglicano e decorina induzem alterações morfológicas e do citoesqueleto nos fibroblastos. Tais alterações no citoesqueleto dependem da sinalização de fibroblastos e resultam em um aumento da migração celular, demonstrando seu papel no processo de remodelamento. Tufvesson (2003) analisou através de cultura de células pulmonares o papel dos proteoglicanos, biglicanos e decorinas no processo migratório dos fibroblastos. O autor demonstrou que após a estimulação dessas células com biglicano e decorina há uma reorganização da actina do músculo liso. A decorina também estimulou a expressão da actina do músculo liso nessas células. O nível de mRNA de vários reguladores e efetores intracelulares envolvidos na migração celular foi aumentado, como as GTPases,

Rho e RhoA. Após a estimulação de biglicano ou decorina, resultados adicionais mostraram uma ativação aumentada de RhoA (1,8 e 1,5 vezes, respectivamente) após 15 minutos.

Não encontramos estudos avaliando a modulação destes marcadores no pulmão com o tratamento da Rho-quinase associada ao anti-IL17.

Neste trabalho está mostrado a atenuação de células positivas para TGF- β em animais tratados com inibidor de Rho-quinase e anti-IL17 tanto em vias aéreas quanto em septos alveolares, mostramos também uma potencialização dessa redução em septos alveolares no grupo tratado com a associação do inibidor de Rho-quinase ao anti-IL17. Ji et al. (2014) avaliaram o papel da ROCK e do TGF- β na diferenciação de fibroblastos pulmonares, estimulando a musculatura lisa com TGF- β , inibidor de Rho-quinase (Y-27632) e inibidor da sinalização TGF- β /Smad *in vitro*. Os resultados demonstraram que as células positivas para actina do músculo liso aumentaram após a estimulação com TGF- β e que os inibidores de Rho-quinase suprimiram a diferenciação de fibroblastos do pulmão induzida por TGF- β . Portanto, a via Rho foi envolvida no processo de diferenciação dos fibroblastos pulmonares. Outros estudos corroboram com nossos achados demonstrando atenuação do número de células positivas para TGF- β em cobaias expostas à ovoalbumina que receberam tratamento com inibidor da Rho-quinase quando comparadas a animais não tratados (Righetti et al., 2014; Pigati et al., 2015). Sabendo que citocinas TGF- β e IL-6 são essenciais para a diferenciação das células Th17, Camargo et al. (2018) demonstraram que o uso de anti-IL17 em animais expostos à ovoalbumina atenou o número de células positivas para TGF- β comparativamente a animais não tratados com o

anticorpo. Apesar de existirem estudos que demonstrem a resposta do TGF- β ao inibidor de Rho-quinase e ao anti-IL17, não existem estudos que avaliem esta resposta com os tratamentos associados.

Demonstramos no presente estudo que os marcadores de remodelamento como MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 estavam aumentados no grupo exposto à ovalbulmina e quando tratados com inibidor de Rho-quinase e/ou anti-IL17 foram atenuados. Estudos prévios em cobaias confirmam nossos resultados demonstrando aumento no número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1 nas vias aéreas e no tecido pulmonar de grupo exposto à ovoalbumina em comparação ao grupo controle salina (Pigati et al., 2015). Estudos também confirmam as respostas encontradas nos grupos tratados do presente estudo, mostrando uma diminuição desses marcadores de remodelamento nas vias aéreas e septos alveolares quando os animais foram tratados com inibidor de Rho-quinase ou anti-IL-17. Possa et al., 2012 demonstraram atenuação do número de células positivas para MMP-9 e TIMP-1 em animais que receberam inibidor de Rho-quinase em comparação com animais não tratados e expostos a ovoalbumina. Camargo et al., 2018 demonstraram uma diminuição nas células positivas para MMP-9 e TIMP-1 em animais expostos à ovoalbumina e tratados com anti-IL17. Novamente, não há estudos com a associação dos tratamentos com anti-IL17 e inibidor da Rho-quinase.

Os isoprostanos são um grupo de produtos de peroxidação lipídica que podem contribuir para muitas das alterações fisiopatológicas observadas na asma. São produzidos via a peroxidação do ácido aracdônico, catalizada por radicais livres (Wood; Gibson; Garg, 2003).

Para avaliar a resposta de estresse oxidativo quantificamos células positivas para iNOS, NF-kappaB e o conteúdo de isoprostano PGF-2 α .

Em relação ao conteúdo de isoprostano, houve aumento no grupo exposto à ovoalbumina quando comparado ao grupo controle. Houve atenuação do conteúdo de isoprostano PGF-2 α dos grupos tratados isoladamente ou em associação quando comparados ao grupo sensibilizado e não tratado.

Possa et al. (2012) observaram aumento do conteúdo de isoprostano PGF-2 α nas vias aéreas nos grupos de animais expostos à ovoalbumina em comparação com as cobaias expostas a solução salina, e os animais tratados com Y-27632 apresentaram conteúdos mais baixos de isoprostano PGF-2 α .

Pigati et al. (2015) demonstraram que o conteúdo de isoprostano PGF-2 α nas vias aéreas e septos alveolares foi maior no grupo sensibilizado à ovoalbumina. Os grupos tratados com inibidor de Rho-quinase, corticoesteróide e ambos associados apresentaram uma redução do conteúdo de isoprostano PGF-2 α nas vias aéreas e septos alveolares em comparação com o grupo OVA. Houve também uma potencialização na redução do isoprostano PGF-2 α no grupo com associação dos tratamentos, mas apenas nos septos alveolares.

NO é produzido a partir de L-arginina pela enzima NOS. Contudo, a arginase compete neste mesmo substrato para produzir ureia e L-ornitina. O aumento da atividade da arginase pode assim reduzir a L-arginina para NOS, causando uma diminuição na produção de NO e um aumento na geração de superóxido devido ao desacoplamento de NOS (Kim et al., 2009).

Demonstramos em nosso estudo atenuação do número de células positivas em vias aéreas e septos alveolares para iNOS nos grupos tratados com inibidor de Rho-quinase, estudos prévios utilizando este tratamento em cobaias expostas a ovabulmina apresentam a mesma resposta (Righetti et al., 2014), bem como estudos utilizando anti-IL17 para tratamento de camundongos expostos a ovabulmina (Camargo et al., 2018).

Na avaliação por PCR na expressão de arginase houve aumento da expressão de arginase no grupo OVA quando comparado ao grupo controle e atenuação desta expressão nos grupos tratados comparativamente ao grupo exposto apenas à ovoalbumina.

Vários autores têm sugerido a importância da resposta de estresse oxidativo e da ativação das vias NO-arginase na fisiopatologia da asma, demonstrando uma correlação dessas respostas e a gravidade dos sintomas asmáticos associados à limitação do fluxo aéreo, hiperreatividade e remodelamento de vias aéreas (Brussino et al., 2010; Voynow e Kummarapurugu, 2011)

Estudos têm relatado um aumento na atividade arginase tanto em modelo de asma agudo ou crônico (Maarsingh et al, 2006; 2009; 2011; Meurs et al, 2000; Aristóteles et al., 2013; Abe et al., 2006). Aristóteles et al. (2013) demonstraram em modelo crônico de asma experimental, que o aumento de arginase e células iNOS-positivas foi associado com a constrição do parênquima pulmonar distal. O mecanismo envolvido nessa resposta provavelmente esteve relacionado à modulação da expressão de NF-kB, que contribuiu para a ativação das vias

arginase e iNOS. A associação de inibidor de iNOS e inibidor de arginase potencializou a redução da expressão de isoprostano nesse modelo de asma experimental em cobaias.

No entanto não há estudos avaliando a expressão de arginase quando há a associação de tratamento com anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase.

O fator nuclear do fator de transcrição κ B (NF- κ B) é considerado o principal regulador das respostas imunes inatas e adaptativas, e tem sido demonstrado por desempenhar um papel fundamental nas doenças alérgicas das vias aéreas (Olson et al., 2011). Os fatores de transcrição NF- κ B são ativados em resposta a uma variedade de sinais, incluindo citocinas, patógenos, lesões e outras condições estressantes (Napetschnig e Wu, 2013). Alguns estudos associaram a ativação do NF- κ B com a inflamação, o estresse oxidativo e a remodelação da inflamação pulmonar crônica (Possa et al., 2012; Aristoteles et al., 2013; Camargo et al., 2018). Observamos que o NF- κ B foi reduzido nos animais sensibilizados tratados com o inibidor da Rho-quinase, em comparação aos animais não tratados. Da mesma forma, Xie et al. (2015) utilizando Fasudil em camundongos desafiados com OVA demonstraram redução do muco e da expressão de MUC5AC, controle da inflamação e regulação negativamente dos níveis de IL-17, IL-4 e IL-13 no tecido pulmonar de camundongos desafiados com OVA e também diminuição da expressão e a fosforilação de NF-kappaB e STAT6, bem como a translocação nuclear de NF-kappaB (Xie et al., 2015). Quando ao uso de anti-IL17 para controle da inflamação, Camargo et al. (2018) demonstraram a mesma respostas que nossos resultados apresentando dados de atenuação do número de células positivas em animais expostos a ovabulmina

e tratados com anti-IL17. Porém não existem estudos que avaliem o tratamento com anti-IL17 e inibidor de Rho-quinase associados para controle da inflamação.

A acetilcolina (ACh), um neurotransmissor colinérgico, é embalada em vesículas sinápticas pela atividade de VACHT (transportador de acetilcolina vesicular), (Prado et al., 2013). A ACh liga-se a $\alpha 7$ nAChRs (receptores de acetilcolina nicotínicos) em macrófagos e assim inibe a liberação de citocinas pró- inflamatórias incluindo TNF α , IL-1 β e IL-6 (Wang et al., 2002). A atividade dessa via colinérgica tem sido descrita como importante moduladora da resposta inflamatória (Prado et al, 2013)

Pinheiro et al. (2015) demonstraram que a deficiência de VACHT induziu a inflamação das vias aéreas com níveis aumentados de TNF- α e IL-4, mas não IL-6, IL-13 e IL-10. Os camundongos com níveis diminuídos de VACHT apresentaram aumento da deposição de fibras colágenas e fibras elásticas nas paredes das vias aéreas, o que foi consistente com um aumento nas células inflamatórias positivas para MMP-9 e TIMP-1. A avaliação da função pulmonar *in vivo* mostrou hiperreatividade das vias aéreas à metacolina em camundongos deficientes em VACHT. Os autores concluíram que a via colinérgica intacta é necessária para manter a homeostase do pulmão.

Na avaliação por PCR para a expressão de VACHT no presente estudo houve aumento da expressão de VACHT no grupo OVA quando comparado ao grupo controle e atenuação desta expressão nos grupos tratados comparativamente ao grupo exposto apenas à ovoalbumina.

Provavelmente no presente modelo experimental no qual claramente está estabelecido um processo inflamatório crônico, o aumento na expressão de VACHT deve-se a um mecanismo de controle anti-inflamatório do sistema colinérgico. Quando o processo inflamatório foi atenuado pelos tratamentos houve também diminuição dessa resposta.

Nosso estudo possui algumas limitações que devem ser consideradas, foi utilizado o inibidor de Rho-quinase (Y-27632) em um modelo experimental de inflamação pulmonar através da administração intranasal levando em conta seu efeito de vasodilatação, e risco de perda de animais se fosse administrado via intraperitoneal, porém a administração intranasal pode não ser tão precisa e efetiva quando a forma de administração intraperitoneal em camundongos. Mesmo assim, nossos resultados apoiam a importância da Rho-quinase na hiperresponsividade, inflamação, estresse oxidativo, e remodelamento.

Outra limitação é que não podemos extrapolar diretamente esses achados para aqueles esperados em humanos, embora já exista estudos *in vitro* e em animais experimentais com tratamento do inibidor de Rho-quinase para outras doenças como vasoconstrição cerebral, hipertensão pulmonar e câncer e também aprovação para uso clínico no Japão (fasudil e ripasudil) e China (fasudil), para o tratamento do vasoespasma cerebral e, mais recentemente, o ripasudil para o tratamento do glaucoma. Sendo assim os inibidores de Rho-quinase podem se tornar uma opção terapêutica para o tratamento de asma no futuro.

Observamos na avaliação da expressão gênica de IL-17 uma resposta semelhante a análise da imuno-histoquímica. Porém seria interessante avaliar os fatores de transcrição ROR γ t e ROR α que são expressos em células Th17 e importantes na diferenciação Th17, e IL-23 também envolvida na indução da diferenciação de células CD4+ em células Th17, para uma maior compreensão do mecanismo gênico e de diferenciação desde perfil de células T auxiliares.

7 CONCLUSÕES

A associação dos dois tratamentos gerou potencialização do controle da resposta de hiperresponsividade à metacolina da resistência do sistema respiratório. Houve também em vias aéreas potencialização da redução do número de células positivas IL-5 e nos septos alveolares atenuação de células positivas IL-4, IL-5, TGF- β , FOXP3, ROCK1 e ROCK2.

Neste modelo de asma observamos nos animais sensibilizados e tratados com inibidor de Rho-quinase ou com anti-IL-17, quando comparados com animais sensibilizados e não tratados, que houve:

- a) atenuação da hiperresponsividade à metacolina, tanto da resistência quanto da elastância do sistema respiratório e redução no número de células positivas para ROCK1 e ROCK2.
- b) controle da resposta inflamatória avaliada pela redução da contagem no fluido do lavado broncoalveolar das células totais, eosinófilos e macrófagos. Notamos também em vias aéreas e nos septos alveolares a redução do número de células positivas para CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas, NF-kappaB, FOXP3, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 e TNF α ,
- c) controle da resposta de remodelamento da matriz extracelular em vias aéreas e nos septos alveolares com atenuação do conteúdo de biglicano, fibronectina, decorina e fibras colágenas e células positivas para MMP-9, MMP-12 e TIMP-1,

- d) controle da resposta de estresse oxidativo avaliado pela redução do conteúdo de isoprostano e células positivas para iNOS. Uma das vias envolvidas parece ser a da arginase visto que houve também atenuação na expressão gênica de de arginase.
- e) envolvimento do sistema colinérgico anti-inflamatório no controle das respostas encontradas visto que notamos atenuação na expressão gênica de VACHT.

O tratamento com anti-IL17, inibidor de Rho-quinase e a associação dos dois tratamentos parece ser de relevância para o tratamento da asma, pois estes possuem ações em vários aspectos da doença, interferindo diretamente no controle mecanismos patogênicos esperados. A associação destes dois tratamentos seria promissora também frente aos resultados encontrados e seria mais potente em alguns casos quando comparados ao tratamento com apenas um deles, melhorando a função pulmonar e consequentemente qualidade de vida desses doentes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 6° ed. Saunders 2003.
2. Abe, M, et al. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibitors on asthma depending on administration schedule. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 40, n. 6, p.1083-1095, mar. 2006. Elsevier BV.
3. Adachi T, et al. The Functional Role of Rho and Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Kinase in Eotaxin Signaling of Eosinophils. *The Journal Of Immunology*, v. 167, n. 8, p.4609-4615, 15 out. 2001. The American Association of Immunologists.
4. Aihara M, et al. Comparison of effects of Y-27632 and Isoproterenol on release of cytokines from human peripheral T cells. *International Immunopharmacology*, v. 3, n. 12, p.1619-1625, nov. 2003. Elsevier BV.
5. Aihara M, et al. Effect of Y-27632 on release of cytokines from peripheral T cells in asthmatic patients and normal subjects. *International Immunopharmacology*, v. 4, n. 4, p.557-561, abr. 2004. Elsevier BV.
6. Akdis, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*, v. 127, n. 3, p. 701-711, Mar 2011.
7. Akbari O, et al. CD4+ Invariant T-Cell–Receptor+ Natural Killer T Cells in Bronchial Asthma. *New England Journal Of Medicine*, v. 354, n. 11, p.1117-1129. 2006. New England Journal of Medicine.

8. Al Jamal R, Roughley PJ, Ludwig MS. Effect of glycosaminoglycan degradation on lung tissue viscoelasticity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L306–L315, 2001.
9. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128(3):451-62.
10. Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol*. 2010. 72:495-516.
11. Alfvén T, et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle - the PARSIFAL study. *Allergy*, [s.l.], v. 61, n. 4, p.414-421, abr. 2006.
12. Amin K. The Role of the T lymphocytes and Remodeling in Asthma. *Inflammation*, v. 39, n. 4, p. 1475-82, Aug 2016.
13. Andreadis AA, et al. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radical Biology And Medicine*, v. 35, n. 3, p.213-225, 1 ago. 2003. Elsevier BV.
14. Aristoteles LRCRB, et al. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. *Bmc Pulmonary Medicine*, v. 13, n. 1, p.1-13. 2013. Springer Nature.
15. Bagnasco D, et al. A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 170, n. 2, p.122-131, 2016.
16. Barlow JL, et al. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. *Clin Exp Allergy*. 2011;41(10):1447-55.
17. Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. 1996;51(2):218-20.

18. Barnes, PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal Of Clinical Investigation*, v. 118, n. 11, p.3546-3556. 2008. American Society for Clinical Investigation.
19. Barnig, C.; Frossard, N.; Levy, B. D. Towards targeting resolution pathways of airway inflammation in asthma. *Pharmacol Ther*, Jan 2018.
20. Benson RC, Hardy KA, Morris CR. Arginase and Arginine Dysregulation in Asthma. *Journal Of Allergy*, v. 2011, p.1-12, 2011. Hindawi Publishing Corporation.
21. Berry M, et al. TNF- α in asthma. *Current Opinion In Pharmacology*, v. 7, n. 3, p.279-282. 2007. Elsevier BV.
22. Biagioli MC, et al. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26 (3-4):454-62.
23. Biswas, PS. et al. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice. *J Clin Invest*, v. 120, n. 9, p. 3280-95, Sep 2010.
24. Black JL. Asthma—More Muscle Cells or More Muscular Cells? *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, v. 169, n. 9, p.980-981, maio 2004. American Thoracic Society.
25. Boulet, LP. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Opin Pulm Med*, v. 24, n. 1, p. 56-62, 01 2018.
26. Brown, SD, et al. Characterization of a high TNF- α phenotype in children with moderate-to-severe asthma. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, v. 135, n. 6, p.1651-1654. 2015. Elsevier BV.

27. Brussino L, et al. Oxidative stress and airway inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 40, n. 11, p.1642-1647. 2010. Wiley-Blackwell.
28. Buc M, et al. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp*. 2009; 57:331-344.
29. Busse WW, Banks-Schilegel S., Wenzel, S.E. Pathophysiology of severe asthma. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, v. 106, n. 6, p.1033-1042. 2000. Elsevier BV.
30. Busse, WW. The Relationship of Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation. *Chest*, [s.l.], v. 138, n. 2, p.4-10, ago. 2010.
31. Calhoun WJ. Nocturnal asthma. *Chest*. 2003; 123(3 Suppl):399S-405S.
32. Camargo, LN. et al. Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. *Frontiers In Immunology*, [s.l.], v. 8, p.1-10, 5 jan. 2018. Frontiers Media SA.
33. Cavalcante FS, et al. Mechanical interactions between collagen and proteoglycans: implications for the stability of lung tissue. *J Appl Physiol*. 98: 672–679, 2005.
34. Ceylan E, et al. Evaluation of oxidative–antioxidative status and the L-arginine–nitric oxide pathway in asthmatic patients. *Respiratory Medicine*, [s.l.], v. 99, n. 7, p.871-876, jul. 2005. Elsevier BV.
35. Chakir J, 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. 2003. *J Allergy Clin Immunol* 111:1293–1298.

36. Chen Z, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets kappa B-alpha to the ubiquitin-proteosome pathway. *Genes Dev.* 1999; 9:1586-1597.
37. Chiba Y, Misawa M. The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *J. Smooth Muscle Res.* (2004) 40 (4&5): 155–167.
38. Chiba YMK, Misawa M. RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2010; 114(3):239-247.
39. Chiba YMM. The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *Journal Of Smooth Muscle Research*, v. 40, n. 4/5, p.155-167, 2004. Japan Society of Smooth Muscle Research.
40. Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118:551-559.
41. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:789-815.
42. Cruse, G, Bradding, P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. *Eur J Pharmacol*, v. 778, p. 125-38, May 2016.
43. Cua DJ, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003; 421:744–748.
44. Dakhama A, et al. IL-13-producing BLT1-positive CD8 cells are increased in asthma and are associated with airway obstruction. *Allergy.* 2013; 68(5): 666–673.

45. Davies, DE. Epithelial barrier function and immunity in asthma. *Ann Am Thorac Soc*, v. 11 Suppl 5, p. S244-51, Dec 2014.
46. De KJ, et al. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy*. 35: 1361–1369, 2005.
47. Doe C, et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest*. 2010;138(5):1140-7.
48. Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *Journal Of Applied Physiology*, v. 114, n. 7, p.834-843, 10 jan. 2013. American Physiological Society.
49. Donovan GM. Inter-airway structural heterogeneity interacts with dynamic heterogeneity to determine lung function and flow patterns in both asthmatic and control simulated lungs. *J Theor Biol*, v. 435, p. 98-105, Dec 2017.
50. Duerr CU, et al. Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, v. 17, n. 1, p.65-75, 23 nov. 2015. Springer Nature.
51. Ehteshami-Afshar S, et al. The impact of comorbidities on productivity loss in asthma patients. *Respiratory Research*, v. 17, n. 1, p.1-9, 26 ago. 2016. Springer Nature.
52. Erle, DJ, Sheppard D. The cell biology of asthma. *J Cell Bio*, v. 205, n. 5, p.621-631, 9 jun. 2014. Rockefeller University Press.
53. Foster, PS, et al. Modeling T. *Immunol Rev*, v. 278, n. 1, p. 20-40, 07 2017.

54. Fernandes LB, Henry PJ, Goldie RG. Rho kinase as a therapeutic target in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2007; 1:25-33.
55. Fu J, et al. Cloning, Expression, Purification, and Characterization of Rat MMP-12. *Protein Expression And Purification*, [s.l.], v. 21, n. 2, p.268-274, mar. 2001. Elsevier BV.
56. Fu X, et al. The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPγS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle. *Febs Letters*, [s.l.], v. 440, n. 1-2, p.183-187, 27 nov. 1998. Wiley.
57. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22:32-9.
58. Gagliardo R, et al. Persistent Activation of Nuclear Factor-κB Signaling Pathway in Severe Uncontrolled Asthma. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, v. 168, n. 10, p.1190-1198, 15 nov. 2003. American Thoracic Society.
59. Gao, ZG, Jacobson, K. A. Purinergic Signaling in Mast Cell Degranulation and Asthma. *Front Pharmacol*, v. 8, p. 947, 2017.
60. Gauvreau, GM, El-Gammal, AI, O'Byrne, PM. Allergen-induced airway responses. *Eur Respir J*, v. 46, n. 3, p. 819-31, Sep 2015.
61. Ge Q, et al. Differential deposition of fibronectin by asthmatic bronchial epithelial cells. *American Journal Of Physiology - Lung Cellular And Molecular Physiology*, p.1-36, 4 set. 2015. American Physiological Society.
62. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and Prevention Program (GINA) 2016. Disponível em: <http://www.ginaasthma.org>

63. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and Prevention Program (GINA) 2018. Disponível em: <http://www.ginaasthma.org>
64. Grainge CL, et.al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med*. 2011; 364: 2006–2015.
65. Hacken NH. et al. Elevated serum interferon-gamma in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation. *Eur Respir J*. 1998; 11:312-316.
66. Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol*. 2009; 71:489-507.
67. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4 Pt 1):1273-6.
68. Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, and Chung KF. Activation and localisation of transcription factor, nuclear factor-kB, in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1998. 158:1585–1592.
69. Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Frontiers In Pharmacology*, v. 6, p.1-16, 20 nov. 2015.
70. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, 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 Jan;28(1):42-50.
71. Hendeles L, Asmus M, Chresrown S. Evalution of cytokine modulators for asthma. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2004; 5 (Supl): S107-112.

72. Henry PJ, Mann TS, Goldie RG: A Rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005, 18:67-74.
73. Hershey, GKK. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, v. 111, n. 4, p.677-690, abr. 2003. Elsevier BV.
74. Hesslinger C, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases: Table 1. *Biochemical Society Transactions*, [s.l.], v. 37, n. 4, p.886-891, 1 ago. 2009. Portland Press Ltd.
75. Hiscott JJ, et al. Characterization of a functional NF-kB site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell. Biol.* 1993. 13:6231–6240.
76. Hirst SJ, et al. Proliferative aspects of airway smooth muscle. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, v. 114, n. 2, p.2-17, ago. 2004. Elsevier BV.
77. Hocking D. Fibronectin Matrix Deposition and Cell Contractility: Implications for Airway Remodeling in Asthma. *Chest.* 2002; 122:275S-278S.
78. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem Populacional. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. 2015.
79. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I. Pharmacological properties of Y-27632, a specific Inhibitor of Rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000; 57:976–83.
80. Jadhav SH, et al. Induction of Oxidative Stress in Erythrocytes of Male Rats Subchronically Exposed to a Mixture of Eight Metals Found as Groundwater Contaminants in Different Parts of India. *Archives Of Environmental Contamination And Toxicology*, v. 52, n. 1, p.145-151, 9 out. 2006. Springer Nature.

81. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(1):1-6.
82. Jeffery, PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 164, n. 10 Pt 2, p. S28-38, Nov 2001.
83. Jiang H, et al. FOXP3⁺Treg/Th17 cell imbalance in lung tissues of mice with asthma. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):4158-4163
84. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes and Infections*. 2013. v. 2, n. 9, p.60-65, set. 2013. Springer Nature.
85. Jonasson S, et al. Allergen-induced formation of F2-isoprostanes in a murine asthma model identifies oxidative stress in acute airway inflammation in vivo. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2009. Volume 80, Issue 1. Pages 1-7.
86. Jonz MG, Zacccone G. Nervous control of the gills. *Acta Histochem*. 2009.
87. Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small Gtpases*, [s.l.], v. 5, n. 2, p.1-10, 3 abr. 2014. Informa UK Limited.
88. Junttila IS, et al. Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4R α , IL-13R α 1, and γ c regulates relative cytokine sensitivity. *The Journal Of Experimental Medicine*, v. 205, n. 11, p.2595-2608, 13 out. 2008.
89. Kariyawasam HH & Robinson DS. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med* 27, 117-27. 2006.
90. Kasahara, DI, et al. Role of ROCK2 in CD4. *Clin Exp Allergy*, v. 47, n. 2, p. 224-235, Feb 2017.

91. Kawano Y, Noma T. Dual action of IL-4 on mite antigen-induced IgE synthesis in lymphocytes from individuals with bronchial asthma. *Clin Exp Immunol*. 1995 Nov;102(2):389-94.
92. Kenyon NJ, et al. Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: Sources and consequences. *Toxicology And Applied Pharmacology*, v. 230, n. 3, p.269-275, 1 ago. 2008. Elsevier BV.
93. Kim J, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholine hyper-responsiveness in a murine asthma model induced by house dust. *Clinical*, v. 36, n. 1, p.122-132, jan. 2006.
94. Kim JH, Bugaj LJ, Oh YJ, Bivalacqua TJ, Ryoo S, Soucy KG et al. (2009). Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol* 107: 1249–1257.
95. Kim M, et al. Heterogeneity of asthma and COPD overlap. *International Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, [s.l.], v. 13, p.1251-1260, abr. 2018. Dove Medical Press Ltd.
96. Kirstein, F, et al. Role of IL-4 receptor α -positive CD4(+) T cells in chronic airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*, v. 137, n. 6, p. 1852-1862.e9, Jun 2016.
97. Kistemaker, LE, Gosens, R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends In Pharmacological Sciences*, [s.l.], v. 36, n. 3, p.164-171, mar. 2015. Elsevier BV.
98. Kistemaker LE, et al. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: Perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. *Life Sciences*, v. 91, n. 21-22, p.1126-1133, nov. 2012.

99. Kolahian S, Gosens R. Cholinergic Regulation of Airway Inflammation and Remodelling. *Journal Of Allergy*, v. 2012, p.1-9, 2012. Hindawi Publishing Corporation.
100. Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, Huynh ML, Zhou X, Hu H, Wenzel SE. Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(11):1208-15.
101. Krishnan, JA. et al. Corticosteroid use after hospital discharge among high-risk adults with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 170, n. 12, p. 1281-5, Dec 2004.
102. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*, v. 6, p. 620, 2015.
103. Kudo M, et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nature Medicine*, v. 18, n. 4, p.547-554, 4 mar. 2012.
104. Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Current Opinion In Immunology*, v. 16, n. 6, p.702-708, dez. 2004. Elsevier BV.
105. Lajoie S, et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nature Immunology*. v. 11, n. 10, p.928-935, 29 ago. 2010. Springer Nature.
106. Lamourex, François et al. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays*, v. 29, n. 8, p.758-771, 2007. Wiley-Blackwell.

107. Lanças T, et al. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *Journal Of Applied Physiology*, v. 100, n. 5, p.1610-1616, 1 maio 2006. American Physiological Society.
108. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(3):450-63.
109. Lauzon A, Martin JG. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000research*, v. 5, p.306-315, 9 mar. 2016.
110. Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernander FT, Martins MA, Tibério IF. 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.
111. Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(Suppl 2):95-102.
112. Liu, G. et al. Airway remodelling and inflammation in asthma are dependent on the extracellular matrix protein fibulin-1c. *J Pathol*, v. 243, n. 4, p. 510-523, Dec 2017.
113. Liu L, et al. An Autoregulatory Mechanism Governing Mucociliary Transport Is Sensitive to Mucus Load. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, v. 51, n. 4, p.485-493, out. 2014. American Thoracic Society.
114. Lizuka K, et al. Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *European Journal Of Pharmacology*, [s.l.], v. 406, n. 2, p.273-279, out. 2000. Elsevier BV.
115. Loo SL, Wark PAB. Recent advances in understanding and managing asthma. *F1000research 2016*, New Lambton, p.1-10, 2016.

116. Lose F, et al. A novel tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) polymorphism associated with asthma in Australian women. *Thorax*. 2005; 60:623–628.
117. Loxham M, Davies DE. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, v. 139, n. 6, p. 1736-1751, Jun 2017.
118. Maarsingh H, et al. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respiratory Research*, v. 7, n. 1, p.1-10, 12 jan. 2006. Springer Nature.
119. Maarsingh H, et al. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *European Respiratory Journal*, v. 38, n. 2, p.318-328, 10 fev. 2011. European Respiratory Society (ERS).
120. Maarsingh H, et al. L-Arginine deficiency causes airway hyperresponsiveness after the late asthmatic reaction. *European Respiratory Journal*, v. 34, n. 1, p.191-199, 27 fev. 2009. European Respiratory Society (ERS).
121. Mcparland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol*. 2003;95(1):426-34.
122. Manni ML, et al. Molecular Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in a Murine Model of Steroid-Resistant Airway Inflammation. *The Journal Of Immunology*, v. 196, n. 3, p.963-977, 4 jan. 2016. The American Association of Immunologists.
123. Manuyakorn W. Airway remodelling in asthma: role for mechanical forces. *Asia Pac Allergy*, v. 4, n. 1, p. 19-24, Jan 2014.

124. Marchica CL, et al. A role for decorin in a murine model of allergen-induced asthma. *Ajp: Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 300, n. 6, p.863-873, 4 mar. 2011. American Physiological Society.
125. Meurs H, et al. Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *British Journal Of Pharmacology*, v. 136, n. 3, p.391-398, jun. 2002. Wiley-Blackwell.
126. Meurs H, et al. Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *British Journal Of Pharmacology*, v. 130, n. 8, p.1793-1798, ago. 2000. Wiley-Blackwell.
127. Meyer N, Dallinga JW, Nuss SJ, et al. Defining adult asthma endotypes by clinical features and patterns of volatile organic compounds in exhaled air. *Respiratory Research*. 2014, 15:136.
128. Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson LR, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol*. 2007; 433:113-26.
129. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect*. 2009; 11:625–630.
130. Miotto D, et al. Expression of IFN-gamma-inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1,3, and 4; and eotaxin in Th1 and Th2 mediated lung diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001. Apr; 107 (4): 664-70.
131. Miyahara N, et al. Effector CD8+ T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness. *Nature Medicine*, v. 10, n. 8, p.865-869, 18 jul. 2004. Springer Nature.
132. Molet S, Hamid Q, Davoine F, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108:430–438.

133. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991;21(4):361-74.
134. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-12.
135. Mong PY, Petruccio C, Kaufman HL, Wang Q. Activation of Rho kinase by TNF- α is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2008;180(1):550-8.
136. Mong PY, Wang Q. Activation of Rho kinase isoforms in lung endothelial cells during inflammation. *The Journal of Immunology*. 2009; 182:2385-2394.
137. Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2004; 16:558–564.
138. Murray PJ. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *The Journal Of Immunology*, v. 178, n. 5, p.2623-2629, 20 fev. 2007. The American Association of Immunologists.
139. Nabe T, et al. Complete Dependence on CD4+ Cells in Late Asthmatic Response, but Limited Contribution of the Cells to Airway Remodeling in Sensitized Mice. *Journal Of Pharmacological Sciences*, [s.l.], v. 116, n. 4, p.373-383, 2011.
140. Nabe T, et al. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. *Life Sci*, v. 88, n. 25-26, p. 1127-35, Jun 2011.
141. Nadeem A, et al. Airway and systemic oxidant-antioxidant dysregulation in asthma: A possible scenario of oxidants spill over from lung into blood. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 29, n. 1, p.31-40, out. 2014. Elsevier BV.

142. Nakagawa O, et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *Febs Letters*, [s.l.], v. 392, n. 2, p.189-193, 26 ago. 1996. Wiley.
143. Nanzer AM, Menzies-Gow A. Defining severe asthma – an approach to find new therapies. *European Clinical Respiratory Journal*, v. 1, p.1-9, 5 jun. 2014.
144. Napetschnig J, Wu, H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys*, v. 42, p. 443-68, 2013.
145. Nénan S. et al. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [s.l.], v. 100, n. 1, p.167-172, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO).
146. Newcomb DC, et al. IL-13 regulates Th17 secretion of IL-17A in an IL-10-dependent manner. *J Immunol*, v. 188, n. 3, p. 1027-35, Feb 2012.
147. Newcomb DC, et al. IL-17A Induces Signal Transducers and Activators of Transcription–6–Independent Airway Mucous Cell Metaplasia. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, v. 48, n. 6, p.711-716, jun. 2013.
148. North ML, et al. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Ajp: Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 296, n. 6, p.911-920, 13 mar. 2009. American Physiological Society.
149. Oeser K, et al. T cells are the critical source of IL-4/IL-13 in a mouse model of allergic asthma. *Allergy*, [s.l.], v. 70, n. 11, p.1440-1449, 20 ago. 2015. Wiley-Blackwell.
150. Olson N, et al. Modulation of NF- κ B and hypoxia-inducible factor--1 by S-nitrosoglutathione does not alter allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 44, n. 6, p. 813-23, Jun 2011.

151. Palgan K, Bartuzi Z. Angiogenesis in bronchial asthma. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 28, n. 3, p. 415-20, Sep 2015.
152. Panday A, et al. Transcription Factor NF- κ B: An Update on Intervention Strategies. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, [s.l.], v. 64, n. 6, p.463-483, 28 maio 2016. Springer Nature.
153. Park SJ, Lee YC. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respir Res*. 2010;11:78.
154. Park SY, Jing X, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan Recognition Protein 1 Enhances Experimental Asthma by Promoting Th2 and Th17 and Limiting Regulatory T Cell and Plasmacytoid Dendritic Cell Responses. 2014, *J Immunol*. 2013; 190:3480-3492.
155. Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Biochemical Society Transactions*, v. 34, n. 6, p.1037-1040, 1 dez. 2006. Portland Press Ltd.
156. Pelaia, G et al. Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. *Mediators Of Inflammation*, p.1-8, 2015.
157. Pinheiro NM, et al. Pulmonary Inflammation Is Regulated by the Levels of the Vesicular Acetylcholine Transporter. *Plos One*, v. 10, n. 3, p.1-22, 27 mar. 2015. Public Library of Science (PLOS).
158. Pigati PA, et al. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. *Bmc Pulmonary Medicine*, v. 15, n. 1, p.1-10, 12 ago. 2015. Springer Nature.

159. Pini L, et al. Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. *Eur Respir. J* 29: 71–77, 2007.
160. Possa SS, et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 11, L939–L952. 2012.
161. Prado CM, et al. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Experimental Lung Research*, v. 37, n. 5, p.259-268, 5 abr. 2011.
162. Price D, et al. Types, frequency and impact of asthma triggers on patients' lives: a quantitative study in five European countries. *Journal Of Asthma*, [s.l.], v. 51, n. 2, p.127-135, 4 nov. 2013. Informa UK Limited.
163. Provoost S, et al. Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy*, v. 64, n. 10, p.1539-1546, out. 2009. Wiley-Blackwell.
164. Raedler D, et al. Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, [s.l.], v. 135, n. 1, p.81-91, jan. 2015. Elsevier BV.
165. Radonić A, et al. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [s.l.], v. 313, n. 4, p.856-862, jan. 2004. Elsevier BV.
166. Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*, v. 54, n. 8, p. 577-89, Aug 2001.
167. Ricciardolo FLM. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System. *Physiological Reviews*, v. 84, n. 3, p.731-765, 1 jul. 2004. American Physiological Society.

168. Righetti RF, et al. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 192, p.134-146, fev. 2014. Elsevier BV.
169. Robinson KM, et al. Clinical Consequences of Targeting IL-17 and TH17 in Autoimmune and Allergic Disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*, v. 13, n. 6, p.587-595, 13 jun. 2013.
170. Rogers D. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Current Opinion In Pharmacology*, v. 4, n. 3, p.241-250, jun. 2004. Elsevier BV.
171. Rogers LK, Cismowski MJ. Oxidative stress in the lung – The essential paradox. *Current Opinion In Toxicology*, [s.l.], v. 7, p.37-43, fev. 2018. Elsevier BV.
172. Rogers NK, et al. Extra-cellular matrix proteins induce matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) activity and increase airway smooth muscle contraction in asthma. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e90565, 2014.
173. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, v. 105, n. 3, p.399-408, mar. 2000. Elsevier BV.
174. Rosenwasser LJ. Mechanisms of IgE Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*, v. 11, n. 2, p. 178-83, Apr 2011.
175. Roth M, et al. The role of IgE-receptors in IgE-dependent airway smooth muscle cell remodelling. *PLoS One*, v. 8, n. 2, p. e56015, 2013.
176. Saraiva-Romanholo BM, et al. Comparison of Three Methods for Differential Cell Count in Induced Sputum. *Chest*, [s.l.], v. 124, n. 3, p.1060-1066, set. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.124.3.1060>

177. Schaller M, et al. CD8+ T cell contributions to allergen induced pulmonary inflammation and airway hyperreactivity. *European Journal Of Immunology*, v. 35, n. 7, p.2061-2070, jul. 2005. Wiley-Blackwell.
178. Schaafsma D, Bos ST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *Respiratory Research*. 2006; 7:121.
179. Schaafsma D, et al. Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction. *British Journal Of Pharmacology*, v. 143, n. 4, p.477-484, out. 2004. Wiley-Blackwell.
180. Schaafsma D, et al. The inhaled Rho kinase inhibitor Y-27632 protects against allergen-induced acute bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness, and inflammation. *Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 295, n. 1, p.214-219, 18 abr. 2008. American Physiological Society.
181. Schnyder-Candrian S, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *The Journal Of Experimental Medicine*, v. 203, n. 12, p.2715-2725, 13 nov. 2006. Rockefeller University Press.
182. Scott JA, Grasemann H. Arginine Metabolism in Asthma. *Immunology And Allergy Clinics Of North America*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.767-775, nov. 2014. Elsevier BV.
183. Shiraki, A. et al. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF₂ α -induced contraction in airway smooth muscle. *Clinical & Experimental Allergy*, [s.l.], v. 39, n. 2, p.236-245, fev. 2009. Wiley.

184. Singh J, Shah R, Singh D. Inundation of asthma target research: Untangling asthma riddles. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 41, p.60-85. 2016.
185. Smigiel KS, Parks WC. Matrix Metalloproteinases and Leukocyte Activation. *Progress In Molecular Biology And Translational Science*, [s.l.], p.167-195, 2017. Elsevier.
186. Song C, et al. IL-17-Producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma. *The Journal Of Immunology*, v. 181, n. 9, p.6117-6124, 20 out. 2008. The American Association of Immunologists.
187. Steward RL, et al. Mechanical stretch and shear flow induced reorganization and recruitment of fibronectin in fibroblasts. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 1, n. 1, p.11-16, 8 nov. 2011. Springer Nature.
188. Sylvester JT. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287: L624-L630.
189. Sweilam M, Helmy A, El-Sharnoby JA, El-Bendary A, Erfan AA, Asy HM, et al. Role of Foxp3 and regulatory CD4+CD25+ T-lymphocytes in bronchial asthma. *Egypt J Immunol*. 2008;15(2):113-23.
190. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest*. 1992;90(1):136-41.
191. Taki F, Kume H, Kobayashi T, Ohta H, Aratake H, Shimokata K. Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:599-607.

192. Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, Do Patrocínio M, et al. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1739-47.
193. Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 2005;60(1):23-9.
194. Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cellular And Molecular Life Sciences*, v. 64, n. 10, p.1269-1289, 15 mar. 2007. Springer Nature.
195. Tsitsiou E, et al. Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8+ T cells in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, v. 129, n. 1, p. 95-103, Jan 2012.
196. Tufvesson E. Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *Journal Of Cell Science*, [s.l.], v. 116, n. 23, p.4857-4864, 1 dez. 2003.
197. Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):348S-55S.
198. Tulic MK, Hamid Q. New Insights into the Pathophysiology of the Small Airways in Asthma. *Clinics In Chest Medicine*, v. 27, n. 1, p.41-52, mar. 2006. Elsevier BV.
199. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Natur*. 1997; 389:990-4.

200. Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil Development, Regulation of Eosinophil-Specific Genes, and Role of Eosinophils in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy, Asthma And Immunology Research*, v. 4, n. 2, p.68-78, 2012.
201. Van Den Berge M, Meijer RJ, Kerstjens HA, et al. PC20adenosine 5-monophosphate is more closely associated with airway inflammation in asthma than PC20methacholine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163:1546–1550.
202. Van Resen EL, Sont JK, Evertse CE, Willems LN, Mauad T, Hiemstra PS, et al. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172:837–841.
203. Vermeer PD. et al. MMP9 modulates tight junction integrity and cell viability in human airway epithelia. *American Journal Of Physiology-lung Cellular And Molecular Physiology*, [s.l.], v. 296, n. 5, p.751-762, maio 2009. American Physiological Society.
204. 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.
205. Visekruna, A. et al. Tc9 cells, a new subset of CD8(+) T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *Eur J Immunol*, v. 43, n. 3, p. 606-18, Mar 2013.
206. Voynow JA, Kummarapurugu A. Isoprostanes and asthma. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects*, v. 1810, n. 11, p.1091-1095, nov. 2011. Elsevier BV.
207. Wakashin H, et al. IL-23 and Th17 Cells Enhance Th2-Cell-mediated Eosinophilic Airway Inflammation in Mice. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, v. 178, n. 10, p.1023-1032, 15 nov. 2008. American Thoracic Society.

208. Walker J A, Mckenzie, ANJ. TH2 cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, [s.l.], v. 18, n. 2, p.121-133, 30 out. 2017. Springer Nature.
209. Wang H, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, v. 421, n. 6921, p.384-388, 22 dez. 2002. Springer Nature.
210. Wang LX, Wu YG. [Morphological changes following airway remodeling in asthmatic rats]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, v. 1, n. 1, p. 62-5, May 2003.
211. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011; 11:388-94.
212. Wessler IK, Irkpatrick CJ. The Non-neuronal Cholinergic System: an Emerging Drug Target in the Airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 14, n. 6, p.423-434, dez. 2001. Elsevier BV.
213. Westergren-Thorsson G, et al. Correlation between airway responsiveness and proteoglycan production by bronchial fibroblasts from normal and asthmatic subjects. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, v. 34, n. 10, p.1256-1267, out. 2002. Elsevier BV.
214. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology an pathophysiology. *J Mol Med*. 2001; 80:629-638.
215. Wijesinghe M, Weatherall M, Perrin K, Crane J, Beasley R. International trends in asthma mortality rates in the 5- to 34-year age group: a call for closer surveillance. *Chest* 135, 1045–1049. 2009.
216. Willis CR, et al. IL-17RA Signaling in Airway Inflammation and Bronchial Hyperreactivity in Allergic Asthma. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, v. 53, n. 6, p.810-821, dez. 2015. American Thoracic Society.

217. Witzernath M, et al. Rho-kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness. *Experimental And Toxicologic Pathology*, v. 60, n. 1, p.9-15, jun. 2008. Elsevier BV.
218. Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *European Respiratory Journal*, v. 21, n. 1, p.177-186, jan. 2003. *European Respiratory Society* (ERS).
219. World Health Organization. Office of Health Communications and Public Relations. Asthma. Geneva: World Health Organization; 2015.
220. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998;336 (Pt 1):1-17.
221. Xiao W. Advances in NF-B Signaling Transduction and Transcription. *Cellular e Molecular Immunology*. 2004;1(6):425-436.
222. Xie T, et al. Rho-kinase inhibitor fasudil reduces allergic airway inflammation and mucus hypersecretion by regulating STAT6 and NFkB. *Clin Exp Allergy*, v. 45, n. 12, p. 1812-22, Dec 2015.
223. Yssel H, Groux, H. Characterization of T Cell Subpopulations Involved in the Pathogenesis of Asthma and Allergic Diseases. *International Archives Of Allergy And Immunology*, v. 121, n. 1, p.10-18, 3 fev. 2000. S. Karger AG.
224. Yoshi A, Lizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T, et al. Relaxation of contractd rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca²⁺ sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 20:1190-2000.
225. Zhu J, et al. Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF-β in ARPE-19. *Int J Ophthalmol*. Vol 6, n.1. 2013.

226. Zhu M. et al. Role of Rho kinase isoforms in murine allergic airway responses. *European Respiratory Journal*, [s.l.], v. 38, n. 4, p.841-850, 12 maio 2011. European Respiratory Society (ERS).