ARIANA CORRÊA FLORENCIO

**Efeitos do inibidor específico para serinoprotease rBmTI-A em
modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica
em camundongos *Balb/c***

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

Programa de Ciência Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Edna Aparecida Leick

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

Florencio, Arianã Corrêa
Efeitos do inibidor específico para
serinoprotease rBmTI-A em modelo experimental de
inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos
Balb/c / Arianã Corrêa Florencio. -- São Paulo,
2018.

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

Descritores: 1. Asma 2. Inflamação 3. Remodelamento
das vias aéreas 4. Inibidores de proteases
5. Serinoproteases 6. Modelos animais

USP/FM/DBD-062/18

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

DEDICATÓRIA |

*À minha família,
em especial aos meus pais, Elsa e Ivaldo
e à minha avó Helena “In Memoriam”
por não desistirem de mim.*

*“Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana.”*

Carl Jung

AGRADECIMENTOS |

Primeiramente agradeço a Deus, o grande maestro, que de alguma forma conduziu este projeto.

Aos meus pais e irmã, que são minha base e fortaleza. Especialmente pelo apoio e incentivo no decorrer dessa jornada, mesmo quando ela parecia não ter fim (risos).

À querida Edninha, a melhor orientadora-mãe-amiga que poderia existir! Por compartilhar generosamente comigo todo o seu conhecimento, experiência e pela abertura de sempre. Pelo exemplo de humildade, ética, competência e acima de tudo pela humanidade que encanta a todos. E por contribuir de forma imensurável para o meu crescimento profissional e pessoal, minha enorme e eterna gratidão.

Adriana Palmeira, pela confiança ao me apresentar uma orientadora e laboratório incríveis, permitindo o primeiro passo dessa caminhada.

Equipe do Lim-20: Beatriz Saraiva, Clarice Olivo, Davi Ferreira, Fernanda Arantes, Fernanda Lopes, Iolanda Tibério, Robson Almeida, Rosana Paz, Sara Hamaguchi, todos pesquisadores, alunos e funcionários que colaboraram de modo direto ou indireto para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Ao Dr. Sérgio Sasaki e Adriana Feliciano, por toda colaboração com o rBmTI-A. Desde o fornecimento do inibidor, até os esclarecimentos e análises.

Às minhas queridas amigas do “sexteto fantástico” e à Kariana Mayumi, por terem sempre ouvidos abertos, mãos estendidas e o copo levantado para o próximo brinde.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital das Clínicas, pela torcida e apoio de sempre. E pela capacidade de levarem alegria para um ambiente tão crítico, sem deixar de lado a competência no cuidado com o próximo, tornando nossos plantões mais agradáveis e minha jornada dupla, de pesquisa e assistência, mais leve.

Aos meus amigos do Phila, do G2 da faculdade e Suelem, que mesmo de longe continuam compartilhando apoio, risadas e angústias. Vocês são exemplos de pessoas do bem e alimentam minhas esperanças de que podemos construir um mundo melhor.

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

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

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

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

SUMÁRIO |

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Asma Brônquica	1
1.1.1	Definição e descrição.....	1
1.1.2	Epidemiologia.....	3
1.1.3	Fisiopatologia	5
1.1.3.1	Sensibilização	5
1.1.3.2	Resposta Inflamatória.....	7
1.1.3.3	Citocinas Inflamatórias na Asma	10
1.1.3.4	Hiper-responsividade	12
1.1.3.5	Remodelamento	13
1.1.4	Asma Grave e Tratamentos.....	17
1.2	Serinoproteases.....	19
1.2.1	Inibidores de Serinoproteases.....	20
1.2.2	Inibidor de Serinoproteases rBmTI-A (<i>Boophilus microplus</i> trypsin inhibitor)	23
1.3	Justificativas para o estudo	25
2.	OBJETIVOS.....	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Animais.....	29
3.2	Descarte dos Animais	30
3.3	Grupos Experimentais	30
3.4	Protocolo de Sensibilização por Ovalbumina (OVA)	31
3.5	Extração e Purificação do rBmTI-A.....	31
3.5.1	Expressão do Inibidor Recombinante rBmTI-A	32
3.5.2	Purificação do Inibidor Recombinante rBmTI-A.....	33
3.5.3	Concentração da Amostra do Inibidor rBmTI-A	34
3.6	Protocolo de Tratamento com rBmTI-A	34
3.7	Medidas de Mecânica Respiratória	36

3.8	Avaliação do Fluido do Lavado Broncoalveolar.....	37
3.8.1	Contagem Total de Células	38
3.8.2	Contagem Diferencial de Células	39
3.9	Determinação da Concentração de Citocinas por Citometria de Fluxo (<i>Cytometric Bead Array</i>).....	39
3.10	Estudo Morfométrico.....	40
3.10.1	Quantificação de Eosinófilos	41
3.10.2	Avaliação das Imagens para Medida de Densidade Óptica.....	42
3.11	Avaliação Imuno-histoquímica.....	44
3.12	Avaliação da Atividade Proteolítica do Homogenato Pulmonar.....	47
3.13	Análise Estatística	48
4.	RESULTADOS	49
4.1	Avaliação da Mecânica Respiratória	49
4.1.1	Resposta Máxima da Elastância do Sistema Respiratório	49
4.1.2	Resposta Máxima da Resistência do Sistema Respiratório	49
4.2	Estudo Morfométrico	51
4.2.1	Avaliação do Infiltrado Eosinofílico	51
4.2.2	Avaliação da Fração de Volume das Fibras Colágenas	51
4.2.3	Avaliação da Fração de Volume das Fibras Elásticas	51
4.3	Avaliação Imuno-histoquímica.....	51
4.3.1	Expressão de IL-4 nas Vias Aéreas	53
4.3.2	Expressão de IL-5 nas Vias Aéreas	53
4.3.3	Expressão de IL-10 nas Vias Aéreas	53
4.3.4	Expressão de IL-13 nas Vias Aéreas.....	54
4.3.5	Expressão de IL-17 nas Vias Aéreas	54
4.3.6	Expressão de MMP-9 nas Vias Aéreas.....	54
4.3.7	Expressão de TIMP-1 nas Vias Aéreas.....	55
4.4	Avaliação Qualitativa.....	57
4.5	Células Inflamatórias no Fluido do Lavado Broncoalveolar	61
4.5.1	Células Totais no Fluido do Lavado Broncoalveolar.....	61
4.5.2	Polimorfonucleares no Fluido do Lavado Broncoalveolar.....	61
4.5.3	Linfócitos no Fluido do Lavado Broncoalveolar	61
4.5.4	Macrófagos no Fluido do Lavado Broncoalveolar	62
4.6	Quantificação de Citocinas no Lavado Broncoalveolar (CBA)	63

4.6.1	IL-4 no Fluido do Lavado Broncoalveolar	63
4.6.2	IL-5 no Fluido do Lavado Broncoalveolar	63
4.6.3	IL-10 no Fluido do Lavado Broncoalveolar	63
4.6.4	IL-13 no Fluido do Lavado Broncoalveolar	64
4.6.5	IL-17 no Fluido do Lavado Broncoalveolar	64
4.6.6	INF- γ no Fluido do Lavado Broncoalveolar	65
4.7	Avaliação da Atividade Proteolítica no Homogenato Pulmonar	66
4.7.1	Atividade Proteolítica de MMP-1 e MMP-9.....	66
4.7.2	Atividade Proteolítica de Tripsina- <i>like</i> no Homogenato Pulmonar.....	66
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÕES	83
7.	REFERÊNCIAS	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS |

AEBSF	Fluoreto de 4-(2-amino-etil)-benzenossulfonato
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno (do inglês, <i>antigen</i>
<i>presenting cell</i>)	
BmTI-A	Boophilus microplus trypsin inhibitor
BPTI	Bovine pancreatic Trypsin Inhibitor
CD	Molécula de adesão
cDNA	DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA
CrataBL	Crataeva tapiaBark Lectin
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAB	Cromógeno diaminobenzidina
DATASUS	Departamento de informática do SUS
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EcTI	Enterolobium contortisiliquum Trypsin inhibitor
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EGF	Fator de crescimento epitelial
eNOS	Óxido nítrico síntese endotelial
Ers	Elastância do sistema respiratório
FGF	Fator de agregação plaquetária
FLBA	Fluido do lavado broncoalveolar
FMUSP	Faculdade de Medicina da Usp
FOY	Mesilato de Gabexato
FUT	Mesilato de Nafamostato
GM-CSF	Fator estimulante de granulócitos e macrófagos
HNE	Elastase neutrofílica humana
HuPK	Calicreína plasmática humana
ICAM-1	Molécula de adesão celular 1
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina clássica
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico síntese induzida
KI	Constantes inibitórias
LTC-4	Linfócito T auxiliar
MBP	Proteína básica principal
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovoalbumina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAR-1	Receptor ativado por protease 1
PAR-2	Receptor ativado por protease 2
PGD2	Prostaglandina D2
PBS	Solução tampão salina

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
Ptr	Pressão traqueal
rBmTI-A	Recombinante do <i>Boophilus microplus</i> Trypsin Inhibitor
RFU	Unidade relativa de fluorescência
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
Rrs	Resistência do sistema respiratório
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	T helper
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz
TXA2	Tromboxano A2
UTI	Ulinastatin
V	Volume pulmonar
V'	Fluxo aéreo
VCAM-1	Molécula vascular de adesão 1
VLA-4	Antígeno tardio

Florencio AC. *Efeitos do inibidor específico para serinoprotease rBmTI-A em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos Balb/c* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A asma ainda acomete um número crescente de indivíduos, podendo ser muito grave e, algumas vezes, fatal. Apesar da melhor eficiência diagnóstica e eficácia terapêutica, a maioria dos asmáticos graves não obtém controle total dos sintomas com as terapias disponíveis. Alguns estudos sugerem a atuação de inibidores de serinoproteases em diversos processos inflamatórios, entre estes inibidores encontra-se o *Boophilus microplus trypsin Inhibitor* (BmTI-A). **OBJETIVO:** Avaliar se o recombinante do inibidor de serinoproteases rBmTI-A modula a hiperresponsividade brônquica à metacolina, inflamação e remodelamento das vias aéreas em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. **MÉTODOS:** Camundongos *Balb-c* foram divididos em 4 grupos: SAL (salina), OVA (sensibilizados com ovoalbumina), SAL+rBmTI-A (controle tratados com rBmTI-A) e OVA+rBmTI-A (sensibilizados com ovoalbumina e tratados com rBmTI-A). Nos dias 0 e 14 do protocolo, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p) de salina (0,9% NaCl) (SAL e SAL+rBmTI-A) e ovoalbumina (50 µg/mL) (OVA e OVA+rBmTI-A). Nos dias 22, 24, 26 e 28 foram submetidos à inalação com salina (0,9% NaCl) ou ovoalbumina (10 mg/ml) e foram tratados com rBmTI-A (35,54 pmol em 50 µL de NaCl) ou apenas salina, via instilação nasal, nos dias 22 e 28. No dia 29, foram realizadas as seguintes análises: hiper-responsividade à metacolina e respostas máximas de resistência e elastância do sistema respiratório; quantificação do número total de células, macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA); determinação da concentração das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A e IFN-γ no FLBA por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA); avaliação da expressão de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, MMP-9 e TIMP-1 nas vias aéreas; análise histopatológica do pulmão para quantificação de eosinófilos, fibras colágenas e elásticas e avaliação da atividade proteolítica de tripsina-like, MMP-1 e MMP-9. A significância foi considerada quando $p < 0,05$. **RESULTADOS:** O tratamento com rBmTI-A nos animais sensibilizados reduziu a atividade proteolítica de tripsina no tecido pulmonar; a resposta máxima de Rrs e Ers; o número de polimorfonucleares e a concentração de IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A no FLBA; a expressão de IL-5, IL-13, IL-17, MMP-9 e TIMP-1 nas vias aéreas; o número de eosinófilos e a fração de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas do grupo OVA+rBmTI-A comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** O rBmTI-A atenuou a hiper-responsividade brônquica, a inflamação e o remodelamento nesse modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Embora mais estudos precisem ser realizados, este inibidor pode contribuir como potencial ferramenta terapêutica para o tratamento de asma.

Descritores: asma; inflamação; remodelamento das vias aéreas; inibidores de proteases; serinoproteases; modelos animais.

SUMMARY

Florencio AC. *Effects of the specific inhibitor for serine protease rBmTI-A in an experimental model of chronic allergic pulmonary inflammation in Balb/c mice* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Asthma still affects an increasing number of individuals and can be very serious and sometimes fatal. Despite the improved diagnostic efficiency and therapeutic efficacy, most severe asthmatics do not have complete symptom control with available therapies. Some studies suggest the role of serine protease inhibitors in various inflammatory processes, such as *Boophilus microplus trypsin inhibitor* (BmTI-A). **AIMS:** To evaluate whether rBmTI-A serine protease inhibitor recombinant modulates bronchial hyperresponsiveness to methacholine, airway inflammation and remodeling in an experimental model of chronic allergic lung inflammation. **METHODS:** Balb/c mice were divided in four groups: SAL (saline), OVA (sensitized with ovalbumin), SAL+rBmTI-A (control treated with rBmTI-A) and OVA+rBmTI-A (sensitized with ovalbumin and treated with rBmTI-A). On days 0 and 14 of the protocol the animals received intraperitoneal injection (i.p) of saline (0.9% NaCl) (SAL and SAL+rBmTI-A) and ovalbumin (50 µg/mL) (OVA and OVA+rBmTI-A). On days 22, 24, 26 and 28 the groups were submitted to inhalations with saline (0.9% NaCl) or ovalbumin (10 mg/ml) and were treated with a rBmTI-A (35.54 pmol in 50 µL of saline or just saline) by nasal instillation, on the days 22 and 28. On day 29, the following analysis were performed: hyperresponsiveness to methacholine and the maximal resistance and elastance responses of the respiratory system were obtained; quantification of the total number of cells, macrophages, lymphocytes and polymorphonuclear in bronchoalveolar lavage fluid (FLBA); determination of the cytokines IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A and IFN-γ concentration in FLBA by *Cytometric Bead Array* (CBA); IL4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, MMP-9 and TIMP-1 expression in the airways; histopathological analysis of the lung for quantification of eosinophils, collagen and elastic fibers and evaluation of trypsin-like, MMP-1 and MMP9 proteolytic activity. Significance was considered when $p < 0.05$. **RESULTS:** The treatment with rBmTI-A in sensitized animals reduced: the proteolytic activity of trypsin-like in lung tissue, the maximum response of Rrs and Ers, the number of polymorphonuclear cells and the concentration of IL-5, IL-10, IL-13 and IL-17A in FLBA, the expression of IL-5, IL-13, IL-17, MMP-9 and TIMP-1 in the airways, the number of eosinophils and the fraction of collagen and elastic fibers in the airways of the OVA + rBmTI-A group compared to the OVA group ($p < 0.05$). **CONCLUSION:** rBmTI-A attenuated bronchial hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in this experimental model of chronic allergic pulmonary inflammation. Although more studies need to be performed, this inhibitor may contribute as a potential therapeutic tool for the asthma treatment.

Descriptors: asthma; inflammation; airway remodeling; protease inhibitor; serine proteases; models, animal.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma Brônquica

1.1.1 Definição e Descrição

Asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, considerada uma das condições crônicas mais comuns, que afeta tanto crianças quanto adultos e está associada à alta morbidade e mortalidade, sendo um problema mundial de saúde (GINA, 2017).

A *Global Initiative for Asthma* a descreve como uma doença heterogênea, usualmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas e é definida pelo histórico de sintomas como chiado, falta de ar, aperto no peito e tosse, que variam de intensidade ao longo do tempo, juntamente com a limitação variável do fluxo aéreo expiratório. Essas variações podem ser desencadeadas por diferentes fatores, tais como exercício, exposição a alérgenos ou irritantes, mudança no tempo ou infecção respiratória viral (GINA, 2017).

A asma é uma doença multifatorial que pode acometer todas as faixas etárias, embora na maioria dos indivíduos asmáticos, a doença tenha sua origem durante a infância, com tendência ao desaparecimento de episódios de sibilos com o passar do tempo. Alguns asmáticos evoluem com sintomas persistentes que podem cessar ainda na adolescência, mas outros evoluem com sintomas que podem tanto cessar antes da adolescência (indivíduos primariamente não atópicos), quanto continuar após esse período (indivíduos atópicos). Uma vez em remissão, a doença pode permanecer em repouso ou o

indivíduo pode apresentar crises ao longo da fase adulta (Lemanske e Busse, 2010).

A história natural dessa patologia inclui episódios agudos (exacerbações) que revertem espontaneamente ou com tratamento, sobre um segundo plano de inflamação crônica e/ou mudanças estruturais que podem estar associadas a sintomas persistentes com ou sem redução da função pulmonar (Lemanske e Busse, 2010; GINA, 2017).

Há dois fatores principais que podem desencadear o processo da inflamação e da hiper-responsividade brônquica presentes na crise asmática. São eles fatores predisponentes (genéticos) e o segundo fator refere-se a uma estreita relação entre os fatores ambientais e a doença, tais como: poeira, alimentos, fármacos, pólen, fungos, insetos, exercício, alterações ambientais e meteorológicas, poluentes atmosféricos, infecções, irritantes químicos, estresse e vários outros (Lemanske e Busse, 2010).

O papel do perfil fenotípico da asma, que envolve características clínicas, inflamatórias e genéticas, tem sido bastante discutido e essas características são fundamentais para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença e da resposta ao tratamento (Chung e Barnes, 1999). No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender a utilidade clínica da classificação fenotípica da asma, uma vez que ainda não existem dados suficientes que comprovem a relação direta entre as características patológicas e padrões clínicos específicos ou as respostas ao tratamento (Anderson, 2008; GINA, 2017).

O diagnóstico da asma deve ser realizado com base no histórico de padrões de sintomas característicos e evidência de limitação do fluxo aéreo

variável que deve ser documentado por meio de teste de reversibilidade ao broncodilatador ou outros testes (GINA, 2017).

1.1.2 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que atualmente 235 milhões de pessoas sofram de asma, sendo considerada ainda, a doença crônica que mais afeta crianças no mundo (OMS, 2018).

A prevalência global da asma doença varia entre 1% e 18% da população nos diferentes países. E a perspectiva é de que até 2025 haja um crescimento de 14% na população urbanizada, com consequente aumento de 100 milhões de pessoas na população asmática (Masoli et al., 2004).

Apesar dos recentes avanços no conhecimento sobre a fisiopatologia e tratamento da doença, o aumento da prevalência e mortalidade por asma nas últimas décadas continua sendo preocupante (O'Byrne, 2010). É estimado que a asma provoque cerca de 346.000 mortes por ano no mundo todo (Lozano et al., 2013).

Têm sido sugeridos para explicar esse aumento da prevalência da asma, aspectos ambientais, nutricionais, econômicos e psicossociais (Asher, 2010; Alves et al., 2012).

Sugere-se ainda, que o aumento da prevalência da asma em locais com alto índice de desenvolvimento socioeconômico seja decorrente de uma menor exposição a microorganismos na infância (pelas melhores condições de higiene), não estimulando o desenvolvimento de um mecanismo de defesa equilibrado, uma vez que existe a hipótese de que a exposição precoce a antígenos pode educar o sistema imunológico prevenindo respostas imunes

desreguladas (Tse e Horner, 2008). Devemos considerar ainda, a piora crescente da qualidade do ar nos grandes centros, provocada pelo aumento da emissão de poluentes das indústrias e automóveis (Kim e Bernstein, 2009).

Por outro lado, mais de 80% das mortes provocadas pela asma ocorre nos países de renda baixa e médio-baixa (OMS, 2018), onde os gastos com a asma grave consomem quase 25% da renda familiar, sendo que a recomendação da Organização Mundial de Saúde é de que esse montante não exceda a 5% da renda familiar (Franco et al., 2009).

O custo total da doença, incluindo custos médicos diretos e indiretos causados por perda de produtividade é estimado em mais de 18 bilhões de dólares anualmente nos EUA (Lambrecht e Hammad, 2015).

Segundo dados do DATASUS (*Tabela 1*), em 2015 e 2016, a asma foi a causa de 208.146 internações e de 1.100 óbitos no Brasil, nesse período mais de 114 milhões de reais foram gastos no tratamento da asma, sendo 107 milhões de reais decorrentes de internações hospitalares (DATASUS, 2017),.

Ano	Internações	Óbitos	Serviços Hospitalares	Gasto total
2015	113.730	543	R\$ 58.652.235,96	R\$ 62.326.539,57
2016	94.416	557	R\$ 49.262.024,12	R\$ 52.403.242,64
TOTAL	208.146	1.100	R\$ 107.914.260,08	R\$ 114.729.485,28

Tabela 1. Número de internações, óbitos e gastos com serviços hospitalares e gastos totais decorrentes da asma no Brasil nos anos de 2015 e 2016. Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS).

Além do impacto econômico, existem ainda as repercussões pessoais como as perdas por prejuízo de produtividade nos estudos, no trabalho, e o mais grave, o óbito prematuro por insuficiência respiratória (Ernst, 2006; Bahadori et al., 2009).

A asma fatal ocorre normalmente em um cenário de sintomas crônicos graves, frequentemente associados a anormalidades permanentes da função pulmonar, admissões recorrentes ao hospital, uso incorreto de medicações, fatores psicológicos e subestimação da gravidade da doença (James e Wenzel, 2007).

Assim, a asma representa um forte impacto no cenário econômico e de saúde. E embora os pacientes com doença leve respondam bem aos broncodilatadores inalatórios e/ou corticosteroides, altas doses e o uso prolongado dessas medicações estão associados a efeitos colaterais indesejáveis (Scichilone et al., 2015). Além disso, alguns pacientes são refratários a esses tratamentos, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novas terapias mais eficientes para o tratamento da asma.

1.1.3 Fisiopatologia

1.1.3.1 Sensibilização

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas, na qual muitas células do sistema imune inato e adaptativo atuam juntamente com as células epiteliais (Lambrecht e Hammad, 2015). É uma patologia extremamente heterogênea que se desenvolve sob diversas apresentações clínicas ou fenótipos com mecanismos patogênicos distintos que podem ser induzidos pela exposição a um alérgeno específico, infecções respiratórias, estresse oxidativo poluentes, dentre outros (Martin-Orozco et al., 2017).

Embora o sistema respiratório possua uma série de mecanismos de defesa pulmonar que limitem o acesso dos antígenos ao sistema imunológico, o contato com o antígeno externo ocorre pela via aérea (Peters-Golden, 2004).

A camada epitelial é a primeira barreira natural de proteção das vias aéreas contra a entrada de alérgenos, microorganismos e outros poluentes ambientais (van den Wijngaart et al., 2015). Assim a ruptura epitelial desse tecido desempenha um papel relevante na amplificação da inflamação, por perda da sua função de barreira e alteração do transporte mucociliar, permitindo a penetração de alérgenos e prejudicando a liberação de enzimas que degradam mediadores inflamatórios (Bousquet et al., 2000).

Assim que os antígenos penetram na camada epitelial, são interceptados pelas células apresentadoras de antígenos (APC do inglês, *antigen presenting cells*). As APCs são macrófagos, células epiteliais e principalmente as células dendríticas que iram apresentá-los aos linfócitos T auxiliar 0 (Th), ou T *naïve*. A diferenciação dos linfócitos em um perfil de resposta alérgica é influenciada pelas moléculas co-estimulatórias e citocinas expressadas pelas APCs. Na asma, os perfis de respostas predominantes são Th2, TH17 ou mista (Th2/Th17) (Vroman et al., 2015).

No entanto, as APCs também têm também como função induzir tolerância a estes antígenos, através do processo de tolerização, no qual os macrófagos, por exemplo, podem suprimir as respostas imunológicas pulmonares por modularem a atividade das células dendríticas (Kuipers e Lambrecht, 2004).

1.1.3.2 Resposta Inflamatória

Segundo Van den Wijngaart et al. (2015), quando não ocorre o processo de tolerização, duas vias desempenham papel importante na patofisiologia da asma: uma, responsável pela fase imediata (ou aguda), e outra responsável pela fase tardia. Na primeira via (fase aguda), os linfócitos B são transformados em plasmócitos e na presença de citocinas, como as interleucinas IL-4 e IL-13, ocorre troca de imunoglobulina clássica (Ig) para IgE (Busse e Lemanske, 2001). Além disso, as citocinas são responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos (IL-5) e mastócitos (IL-9) (Busse e Lemanske, 2001; Kim et al., 2010). A produção de IgE específica para aquele alérgeno é liberada no sangue periférico e se liga a receptores de IgE na superfície de mastócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos. Ao serem estimuladas, em novo contato com alérgeno específico, ocorre a desgranulação destas células, o que resulta na liberação de mediadores vasoativos e inflamatórios (histamina, prostaglandinas, cisteinil-leucotrienos) que causam dano tecidual direto, broncoconstrição e aumento da permeabilidade vascular (Martin-Orozco et al., 2017).

A desgranulação dos mastócitos provoca também a liberação de potentes espasmógenos da musculatura brônquica, tais como prostaglandina D₂ (PGD₂), tromboxano A₂ (TXA₂) e fator de agregação plaquetária (PAF). As células endoteliais, quando ativadas, aumentam a secreção de óxido nítrico (NO), provocando o relaxamento do músculo liso subjacente, aumentando ainda mais a permeabilidade vascular e causando efeitos citotóxicos. (Wagner e Roth, 1999; Redington, 2006).

Todas essas células são responsáveis pelo recrutamento de mais células para o local da inflamação (principalmente eosinófilos recrutados pela IL-5) e, conseqüentemente, amplificam o processo de inflamação (Busse e Lemanske, 2001).

Os eosinófilos liberam produtos altamente tóxicos (proteína básica principal (MBP); proteína catiônica eosinofílica (ECP); neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN); radicais livre de oxigênio), que induzem lesão tecidual (Gleich et al., 1993). Também são uma rica fonte de leucotrienos, particularmente cisteinil-leucotrieno, o qual contrai o músculo liso das vias aéreas, aumenta a permeabilidade vascular, e pode recrutar mais eosinófilos que, por sua vez, liberam mais leucotrienos, dando sequência a esse ciclo da resposta inflamatória (Vignola et al., 2000; Lemanske e Busse, 2010).

Na fase tardia, os antígenos apresentados por células dendríticas são transformados em pequenos peptídeos que interagem com as células reguladoras e estimulam a produção de linfócitos Th (van den Wijngaart et al., 2015). Durante a ativação dos receptores de células T em um ambiente de citocinas, células T CD4⁺ podem se diferenciar em linhagens definidas pelo padrão de produção de citocinas e fatores de transcrição em células T tipo Th1, Th2, Th17 e Th22; células T auxiliares e células T regulatórias (Vanaudenaerde et al., 2011).

O aumento expressivo de eosinófilos, linfócitos Th2 e células B contribuem para o desbalanceamento de citocinas (Th1 para Th2) e caracterizam a fase tardia da asma (entre 6 a 9 horas após a provocação com o alérgeno). As células Th2 produzem citocinas inflamatórias que são capazes de amplificar sua própria proliferação, de células B e eosinófilos. Nesta fase

também ocorre aumento da musculatura lisa brônquica, hiperplasia das glândulas produtoras de muco e remodelamento. Além disso, pela deposição de matriz extracelular, há edema, aumento na secreção de muco e espessamento das vias aéreas, contribuindo para uma lesão tecidual com perda de epitélio e alteração nas propriedades mecânicas das vias aéreas. Essa fase pode ainda persistir por vários dias (Bousquet et al., 2000).

O paradigma Th1/Th2 foi mantido até alguns anos atrás quando foi identificado um terceiro subconjunto de células efectoras T CD4+ nomeadas Th17 devido à produção de IL-17 (Oppmann et al., 2000; Cua et al., 2003). Desde então, além do perfil Th2, a atenção tem se voltado para o perfil Th17 como uma via alternativa que pode levar à asma grave e de difícil controle (Newcomb e Peebles, 2013).

As células Th17 são diferenciadas quando uma célula T naive é ativada na presença de TGF- β , IL-6, IL-1 β e IL-23 (Korn et al., 2009). Fenótipos da asma moderada e grave têm sido associados com o aumento de neutrófilos e aumento de citocinas Th17, IL-17A, IL-17F, e IL-22, no FLBA de indivíduos asmáticos. As citocinas Th17 recrutam neutrófilos para as vias aéreas provocando aumento da secreção de quimiocinas epiteliais, induzindo metaplasia de células produtoras de muco, agindo também sobre o estreitamento das vias aéreas (Newcomb e Peebles, 2013).

Os perfis de asma Th2 e Th17 podem coexistir no mesmo paciente. Essa coexistência tem sido associada à maior gravidade da doença e à resistência ao tratamento com corticosteroide (Cosmi et al., 2011; Irvin et al., 2014; Choy et al., 2015).

1.1.3.3 Citocinas Inflamatórias na Asma

As citocinas podem ser produzidas por diversos tipos de células inflamatórias, tais como linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, células estruturais, incluindo células endoteliais, epiteliais e fibroblastos. E estão envolvidas na sinalização célula a célula, crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose. As ações das citocinas são mediadas por receptores específicos presentes na superfície das células-alvo. (Hamid e Tulic, 2009).

Foram identificados mais de 30 citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma. Dentre elas estão as derivadas de células T, tais como as células Th1 (IL-2, IFN- γ e IL-12), células Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25), citocinas T regulatórias ou Th3 (IL-10 e TGF- β) e células Th17 (IL-17). Existem outras classes de citocinas: as pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α), as anti-inflamatórias (IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-18), fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , FGF, EGF) e quimiocinas (RANTES, IL-8) (Hamid e Tulic, 2009; GINA, 2017).

A citocina IL-4 participa de várias fases da resposta inflamatória na asma. Além da capacidade de conduzir a diferenciação de células Th 0 em Th2 (Hsieh et al., 1992), estimula a produção de IgE pelos linfócitos B, o aumento da atividade das células produtoras de muco, a hiper-responsividade das vias aéreas, aumenta a expressão de eotaxina e das moléculas de adesão no epitélio (Lemanske e Busse, 2010; Schuijs et al., 2013).

A IL-5 possui papel essencial no desenvolvimento inflamação alérgica crônica das vias aéreas. Ela atua como principal mediadora na ativação, recrutamento, maturação e supressão da apoptose de eosinófilos, que por sua

vez modulam a resposta inflamatória na asma, estimulam a hiper-responsividade, a hiper secreção de muco e o remodelamento das vias aéreas (Menzies-Gow et al., 2003; Trivedi e Lloyd, 2007; McBrien e Menzies-Gow, 2017).

A IL-10 é uma citocina considerada anti-inflamatória, é capaz suprimir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e inibir respostas alérgicas ((Malefyt et al., 1991; Yang et al., 2000). Por outro lado, parece também exercer um papel pró-inflamatório, tendo influência sobre o aumento da produção de IL-5, consequentemente do infiltrado eosinofílico (Kita et al., 1996; Bachert et al., 1997) e pode estar relacionada ao aumento da hiper-responsividade das vias aéreas (van Scott et al., 2000).

A IL-13 pode ser produzida por células epiteliais, musculares lisas, fibroblastos e monócitos/macrófagos. Ela desempenha importantes papéis na inflamação das vias aéreas e na fibrose subepitelial através da sua atuação na produção de colágeno, na proliferação de fibroblastos, na expressão de metaloproteases (MMP), no estímulo e produção de TGF- β , na hipersecreção de muco e na hiper-responsividade brônquica (Wills-Karp, 2004; Fuschiotti et al., 2013).

O paradigma Th1/Th2 foi mantido até alguns anos atrás quando foi identificado um terceiro subconjunto de células efetoras T CD4+ nomeadas Th17, devido à produção de IL-17 (Oppmann et al., 2000; Cua et al., 2003). Desde então, além do perfil Th2, a atenção tem se voltado para o perfil Th17 como uma via alternativa que pode levar à asma grave e de difícil controle (Newcomb e Peebles, 2013).

A citocina de perfil Th17, IL-17, tem sido associada ao aumento da produção de muco, remodelamento das vias aéreas, exacerbações recorrentes (Aujla e Alcorn, 2011), infiltrado neutrofílico (McKinley et al., 2008; Miossec e Kolls, 2012) e eosinofílico (Dias e Banerjee, 2013; Choy et al., 2015). Além disso, a IL-17 também pode induzir aumento da resistência ao tratamento com corticosteroide (McKinley et al., 2008; Zijlstra et al., 2012).

1.1.3.4 Hiper-responsividade

A hiper-responsividade é uma característica de anormalidade funcional da asma (O'Byrne e Inman, 2003), sendo uma das principais características da doença, encontrada em praticamente todos os pacientes asmáticos. Graus mais elevados de hiper-responsividade são normalmente associados à maior gravidade da doença (Cockcroft e Davis, 2006; Busse, 2010). Sendo assim, a avaliação da hiper-responsividade é considerada útil para o diagnóstico e manejo da asma (GINA, 2017).

Os mecanismos envolvidos na hiper-responsividade ainda não estão totalmente elucidados. Portanto, fatores que alteram a estrutura das vias aéreas parecem estar mais próximos de explicar essa reação (Busse, 2010).

Existem dois tipos de fatores que contribuem para a hiper-responsividade: persistente e variável (Covar, 2007; O'Byrne et al., 2009). Segundo Busse (2010) (*Figura 1*), os fatores persistentes que influenciam a hiper-responsividade são atribuídos às mudanças estruturais (espessamento subendotelial, hipertrofia da musculatura lisa, deposição de matriz e alteração dos elementos vasculares) das vias aéreas. Essas alterações estão associadas à via aérea mais espessa, estreita, e menos complacente, que apresenta um

maior grau de constrição e fechamento quando estimulada por algum alérgeno. Os fatores variáveis estão relacionados aos eventos inflamatórios das vias aéreas, que são influenciados por diversos fatores ambientais (alérgenos, infecções respiratórias e tratamentos).

Figura 1. Fatores persistentes e variáveis que afetam a hiperresponsividade. (Adaptado de Busse, 2010).

1.1.3.5 Remodelamento

O remodelamento é um processo de reparação tecidual que ocorre em diversos órgãos e tecidos e pode ser classificado em fisiológico ou patológico.

No sistema respiratório, o remodelamento fisiológico abrange mudanças estruturais que ocorrem durante o desenvolvimento normal dos pulmões, levando a uma parede da via aérea madura ou restaurada, em resposta a lesões agudas e transitórias. Já o remodelamento patológico, compreende as alterações estruturais resultantes de um desenvolvimento pulmonar perturbado em resposta a lesões crônicas, levando a alterações estruturais e funcionais permanentes da via aérea (Fehrenbach et al., 2017). Esse processo não ocorre somente em vias aéreas centrais, mas também no pulmão distal e parênquima

pulmonar (Tulic e Hamid, 2003; Mauad et al., 2004; Prado et al., 2006; Pigati et al., 2015).

Embora esses processos tenham sido inicialmente considerados como secundários à inflamação crônica das vias aéreas, extensa reestruturação das vias aéreas ocorre no início da doença em crianças e, muitas vezes, até mesmo antes do início dos sintomas (Payne et al., 2003; Pohunek et al., 2005).

Na parede das vias aéreas o aumento de células inflamatórias contribui para o aumento da sua espessura, como hipertrofia das glândulas mucosas, metaplasia do epitélio das vias aéreas em células secretoras de muco, deposição de colágeno (tipo I, III, e V), fibronectina (Roche et al., 1989) e hiperplasia do músculo liso das vias aéreas, o que contribui fundamentalmente para a cronicidade e gravidade da asma (Johnson et al., 2001). O espessamento da parede das vias aéreas varia de 10% a 300% do normal, levando à redução do diâmetro luminal (Homer e Elias, 2000).

Diversas células como T auxiliares (Th), eosinófilos, neutrófilos e mastócitos interagem com as células residentes das vias aéreas, tais como fibroblastos, células musculares lisas, células neuronais, células epiteliais e endoteliais, que juntamente com a liberação de citocinas, enzimas, metabólitos e fatores de crescimento criam um ambiente de sinalização que em condições crônicas resulta no remodelamento das vias aéreas (Fehrenbach et al., 2017).

A *Figura 2* mostra os principais mecanismos e células envolvidas no remodelamento das vias aéreas.

Figura 2. Alterações na parede da via aérea decorrentes do processo de remodelamento. (Adaptado de Grzela et al., 2015).

A matriz extracelular situada abaixo do epitélio brônquico promove suporte estrutural e orientação espacial celular e também regula o tráfego celular e de macromoléculas. É composta por uma mistura de colágeno, elastina, proteoglicanos, laminina e fibronectina.

Os fibroblastos participam do processo de remodelamento produzindo fibras colágenas, elásticas e reticulares, bem como proteoglicanos e glicoproteínas da matriz extracelular amorfa (Sheppard e Harrison, 1992).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas que desempenham papéis centrais nas alterações da matriz extracelular, participam da degradação dos tecidos, de mecanismos de reparação e migração celular (Farhat et al., 2014).

As MMPs constituem uma família de 11 ou mais endopeptidases zinco-dependentes, que são expressas em níveis elevados durante o desenvolvimento, reparo tecidual, inflamação, invasão tumoral e metástases, mas se encontram em baixas concentrações em tecido adulto normal (Lee et al., 2001).

A transcrição de genes das MMPs pode ser induzida ou inibida por fatores de crescimento e citocinas (Lee et al., 2001). As MMPs ativadas são rapidamente inibidas por uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteases (TIMPs), que impedem a ação descontrolada dessas proteinases e são produzidas pela maioria das células mesenquimais (Cataldo et al., 2003).

Em geral, as metaloproteases elevadas em pacientes asmáticos são: MMP-2, MMP-3, MMP-9 e MMP-12, embora a MMP-9 seja predominante nesses pacientes (Kelly e Jarjour, 2003).

A MMP-3 atua diretamente no remodelamento e pode ser a principal ativadora da MMP-9 (Goldberg et al., 1992; Dahlen et al., 1999). A MMP-12 (metaloelastase) atua na acumulação de eosinófilos e macrófagos (Lanone et al., 2002) e desempenha um papel importante também sobre a fibrose subepitelial (Corry et al., 2002).

As MMP-2 e MMP-9, também são conhecidas como gelatinases por serem capazes de degradar colágeno tipo I, IV, V, VII, X, XI e XIV; gelatina; elastina; proteínas; fibronectina e outros componentes da matriz extracelular. Na asma grave, apenas a MMP-9 apresenta níveis elevados, enquanto na asma leve e moderada aguda, tanto os níveis de MMP-9, quanto de MMP-2 encontram-se elevados. Essa elevação do nível das metaloproteases pode ser

observada no sangue, lavado broncoalveolar, escarro e em biópsias brônquicas (Atkinson e Senior, 2003; Royce et al., 2012).

O aumento de MMP-9 foi observado em pacientes com exacerbação da asma (Tanaka et al., 2000) e após provocação alérgica brônquica (Kelly et al., 2000), sugerindo que a degradação dos componentes da matriz extracelular pelas MMPs e outras proteases, pode ocorrer na fase imediata da asma e a produção de TIMP-1 pode acompanhar esse aumento da MMP-9, na tentativa de inibir o processo de degradação da matriz extracelular (Vignola et al., 2003).

Portanto, o desequilíbrio entre MMPs e TIMPs tem relação direta com o remodelamento, que é considerado como uma importante característica das vias aéreas e do parênquima de asmáticos e pode ser utilizado como parâmetro na classificação de pacientes com asma grave persistente, daqueles com a doença moderada (Benayoun et al., 2003), uma vez que contribui para a progressão da limitação ao fluxo aéreo e para a piora da gravidade dos sintomas e a progressão da doença (Postma e Timens, 2006).

1.1.4 Asma Grave e Tratamentos

A gravidade do quadro asmático requer tratamento com a maioria das opções terapêuticas disponíveis para essa doença, incluindo corticosteroides inalatórios e sistêmicos. Apesar disto, não há um controle adequado dos sintomas e muitos efeitos colaterais são observados (GINA, 2017).

Os corticosteroides podem ser administrados por via inalatória, oral ou parenteral. O seu uso está associado a diversos efeitos colaterais locais e sistêmicos. Os efeitos adversos atribuídos ao uso da inalação incluem candidíase orofaríngea, tosse por irritação, disfonia, supressão adrenal e

diminuição da densidade óssea. Os efeitos sistêmicos consequentes da administração oral ou parenteral incluem diabetes, hipertensão arterial, osteoporose, supressão hipotalâmica-pituitária-adrenérgica, obesidade, catarata, glaucoma, fraqueza muscular e estria cutânea (GINA, 2017).

Diversos estudos mostraram que o tratamento com corticosteroides não atenuou o remodelamento na asma (Jeffery, 1992; Boulet et al., 2000; Chakir et al., 2003; Bergeron et al., 2010). Sendo que o remodelamento está associado a pior prognóstico clínico, risco de morbidade e mortalidade (Bergeron et al., 2010).

Outras terapias são utilizadas no tratamento da asma como os moduladores de leucotrienos, que apresentam propriedades anti-inflamatórias e são eficazes para a resposta asmática precoce e tardia, assim como os agentes anticolinérgicos (Dykewicz, 2001; Perry et al., 2004), não sendo, porém, tão efetivos no influxo linfocitário (Leick-maldonado et al., 2004). Não se mostrando, assim, bem-sucedido no controle total da doença.

Portanto, a busca por novas terapias eficazes para o tratamento da asma se faz necessária e de alta prioridade, principalmente para aqueles indivíduos asmáticos cujos sintomas não são bem controlados pelas medicações disponíveis atualmente (Papaioannou et al., 2015).

Há ainda, a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas que sejam capazes de reverter e prevenir o remodelamento na asma, pois como observado, os corticosteroides não atuam diretamente nas alterações estruturais das vias aéreas (Royce et al., 2012).

1.2 Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que apresentam um resíduo do aminoácido serina no sítio ativo que participa da catálise. Estas enzimas já foram descritas em vírus, bactérias, alguns eucariotos (Barrett e Rawlings, 1995), tais como animais vertebrados e artrópodes (Gorman e Paskewitz, 2001).

A família das serinoproteases engloba exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e ômega peptidases (Barrett e Rawlings, 1995). Essas enzimas são consideradas chaves em diversos processos biológicos (Gorman e Paskewitz, 2001). Além disso, muitos aeroalérgenos associados à asma, como ácaros domésticos e fungos alérgenos, são proteases exógenas. Dois grandes ácaros que atuam como antígenos na asma, Der p 3 e Der p 9, são serinoproteases que podem aumentar a permeabilidade vascular e separar as células epiteliais, a partir da interação com o receptor ativado por proteases PAR-2 (Sun et al., 2001).

As serinoproteases de eucariotos e bactérias estão agrupadas em 20 famílias, divididas em 6 clãs diferentes. Dentre esses, o clã mais numeroso é o SA, que engloba 10 famílias, entre elas a família das quimotripsinas, S1, que se caracteriza por apresentar uma tríade catalítica composta pelos resíduos de Ser-195, His-57 e Asp-102 (Barrett e Rawlings, 1995). Nessa família estão classificadas: a tripsina, a elastase neutrofílica humana (HNE) e a calicreína plasmática humana (HuPK), dentre outras, também consideradas tripsina-*like* por exibirem um padrão muito semelhante de tríade catalítica (Liang e Bowen, 2016).

Essas três serinoproteases parecem estar envolvidas no desenvolvimento da asma. A tripsina possui atuação na contração e no remodelamento das vias aéreas em humanos (Chambers et al., 2001). Por sua vez, a elastase neutrofílica, pode desempenhar um importante papel na degradação de componentes da matriz extracelular e fibras elásticas, bem como na gravidade da doença (Vignola et al., 1998). E segundo Christiansen et al. (1987), a HuPK, presente no FLBA de pacientes asmáticos, participa do processo da cascata inflamatória na asma através da produção de cininas.

1.2.1 Inibidores de Serinoproteases

Os inibidores de proteases atuam através da formação de complexos, onde funcionam na maioria das vezes como pseudo-substratos com capacidade de reduzir a atividade hidrolítica de uma protease sobre um determinado substrato (Pabinger e Schneider, 1996) e podem ser de origem animal ou vegetal (Richardson, 1991).

Muitas proteases são controladas por inibidores naturais específicos e a deficiência deles pode levar a situações patológicas, como por exemplo: a deficiência de antitrombina III que resulta em permanentes problemas de trombose (Rawlings et al., 2004) e de alfa-1 antitripsina que resulta no enfisema pulmonar (Stockley, 2000) e possivelmente possui influência no desenvolvimento da asma (Vignola et al., 1998; Eden et al., 2003).

Por possuírem um papel importante na regulação de células que participam de processos inflamatórios, tem sido atribuído, aos inibidores de protease, uma possível atuação farmacológica. Shigetomi et al. (2010) observaram que inibidores de proteases podem prevenir a inflamação, lesões

teciduais e posteriormente, promover a diminuição no remodelamento de tecidos.

A utilização de inibidores de elastase neutrofílica humana em modelos experimentais tem apresentado resultados satisfatórios na redução da migração de células inflamatórias (Senior e Anthonisen, 1998), da liberação de quimiocinas (Takayama et al., 2001) e, conseqüentemente, do processo inflamatório pulmonar.

Em modelos de doenças respiratórias, alguns inibidores de proteases foram testados e seus potenciais efeitos anti-inflamatórios nas vias aéreas foram demonstrados (Chen et al., 2006; Lin et al., 2014; Pigati et al., 2015; Martins-Olivera et al., 2016; Almeida-Reis et al., 2017; Theodoro-Junior et al., 2017).

Ishizaki et al. (2008), testaram o efeito do inibidor de serinoprotease Mesilato Nafamostato em modelo de asma em murinos. Foi observada a inibição significativa, não só da atividade proteolítica, como também a redução do número de eosinófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar; dos níveis de IL-13 e da hiperplasia das células caliciformes, atuando no processo de remodelamento.

Dos Santos et al. (2014), mostraram que o inibidor de serinoproteases *CrataBL* reduziu parâmetros de inflamação, mecânica pulmonar, remodelamento de vias aéreas e dos septos alveolares em modelo murino de inflamação pulmonar alérgica crônica.

Lin et al. (2014), avaliaram o efeito dos inibidores de serinoproteases FOY (Mesilato de Gabexato), FUT (Mesilato de Nafamostato) e o inibidor de tripsina humana, UTI (Ulinastatin) em modelo de inflamação pulmonar alérgica

crônica em murinos. Os três inibidores reduziram a hiper-responsividade, o infiltrado de células polimorfonucleares e citocinas inflamatórias no FLBA dos animais sensibilizados.

Em outro estudo recente, Saw e Arora (2015) relataram que o inibidor de serinoprotease AEBSF, foi capaz de atenuar diversas respostas inflamatórias em camundongos submetidos à inflamação alérgica das vias aéreas, como: redução da resposta de mecânica pulmonar; da expressão de citocinas de perfil Th2 e IgE; do número de eosinófilos e neutrófilos no FLBA e no tecido pulmonar; e diminuição do estresse oxidativo.

O rBmTI-A (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor), inibidor de serinoprotease extraído do carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus*, mostrou atividades inibitórias sobre tripsina bovina, calicreína plasmática humana e elastase neutrofílica humana (Tanaka et al., 1999; Sasaki et al., 2004). Lourenço et al. (2014) mostraram que o rBmTI-A reduziu o número total de células no FLBA, o número de células positivas para a MMP-12 e o volume das fibras de colágeno em um modelo murino de enfisema pulmonar. O inibidor rBmTI-A também reduziu a elastância tecidual, o número de células positivas para MMP-12, o conteúdo de fibras colágenas e elásticas e aumentou o número de células positivas para TIMP-1 em outro modelo de enfisema pulmonar em murinos (Lourenco et al., 2017).

1.2.2 Inibidor de Serinoproteases rBmTI-A (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor)

A família de inibidores Kunitz-BPTI, é caracterizada por massa molecular geralmente pequena, e possui um ou mais domínios inibitórios específicos para serinoproteases (Fritz e Wunderer, 1983).

O BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) foi o primeiro inibidor caracterizado dessa família. Por isso, esses inibidores são chamados de Kunitz-BPTI para diferenciar dos inibidores do tipo Kunitz de origem vegetal (Bode e Huber, 1991).

Inibidores do tipo Kunitz inibem serinoproteases que atuam em diversos processos fisiológicos como a coagulação sanguínea, fibrinólise e inflamação. Eles funcionam como substratos e se ligam às suas enzimas respectivas em um "loop" exposto de conformação rígida, que fixa a enzima ao inibidor, alocando-o no sítio ativo da protease (Tanaka et al., 1999).

O carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* é um animal estenoxeno e monoxeno, cujo hospedeiro é o bovino. É considerado um parasita exclusivo bovino de grande importância na América, África, Ásia e Oceania. O impacto econômico provocado pela infestação de carrapatos na criação de gado brasileira é significativo. As proteínas do carrapato são bons alvos para serem usadas como ferramentas no seu próprio controle (Tanaka et al., 1999). Os carrapatos são importantes transmissores de doenças tanto para o homem, quanto para outros animais vertebrados (Kaufman, 1989), nos rebanhos bovinos brasileiros encontra-se frequentemente a doença da “tristeza parasitária bovina”, que causa significativos prejuízos ao sistema de produção, é uma infecção microbiana causada pela *Rickettsia Anaplasma* sp e pelo

protozoário *Babesia sp*, transmitida pelo *Rhipicephalus Boophilus microplus* (Horn, 1983).

No carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* foram encontrados diversos inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz-BPTI (Sasaki et al., 2004). Inibidores isolados do extrato de larvas infestantes desse carrapato apresentaram diferenças de tamanho, ou seja, um ou dois domínios Kunitz com atividade sobre HNE, tripsina e HuPK (Sasaki et al., 2004). Estes inibidores foram denominados de BmTIs (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor). Dentre esses inibidores, o BmTI-A foi caracterizado e apresentou atividade inibitória sobre HNE, HuPK e tripsina bovina (Tanaka et al., 1999).

1.3 Justificativas para o estudo

Tendo em vista que o tratamento com corticosteroide ainda é considerado como o tratamento “Gold-Standard” para a asma, mas está associado a diversos efeitos colaterais, tanto locais, quanto sistêmicos e, considerando-se o impacto provocado pela asma na qualidade de vida e no âmbito socioeconômico, torna-se clara a relevância de avaliar novas opções terapêuticas que possam contribuir para seu tratamento. Tem sido atribuído às serinoproteases um importante papel na fisiopatologia de diversos processos inflamatórios, assim como no desenvolvimento da asma. Sendo assim, o objeto de estudo desta pesquisa foi avaliar pela primeira vez os efeitos do inibidor de serinoprotease (rBmTI-A) em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica. Deste modo, este trabalho visa contribuir para a busca de novas alternativas terapêuticas para asma, bem como para o melhor entendimento da fisiopatologia da mesma.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do tratamento com o inibidor de serinoprotease (rBmTI-A) no modelo de asma experimental em camundongos, caracterizando:

1. As alterações da mecânica do sistema respiratório;

Em vias aéreas:

2. O infiltrado eosinofílico;

3. O conteúdo de fibras colágenas e elásticas;

4. A expressão de: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, MMP-9 e TIMP-1;

No lavado broncoalveolar:

5. A concentração de células inflamatórias: polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos;

6. A concentração de citocinas: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A, INF- γ ;

No homogenato de tecido pulmonar:

7. A atividade proteolítica de MMP1, MMP-9 e proteases tripsina-*like*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 32 camundongos Balb/c, machos, com idade entre 6-8 semanas, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério Central que pertence à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os animais foram acondicionados em baias específicas para animais de seu porte, no Biotério de manutenção do LIM-20 (Laboratório de Terapêutica Experimental I) da FMUSP. Os camundongos (aproximadamente 8 animais/baia), foram acondicionados em baias com as seguintes medidas: 425 X 266 X 185 mm (C x L x A). Foram alimentados *ad libitum* e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em condições ideais e controladas de temperatura ambiente (22°C), umidade e ruído, por profissional treinado e capacitado. Este mesmo profissional foi responsável pelos cuidados com os animais durante o período de estada destes no Biotério do LIM-20.

Além disso, os cuidados necessários recebidos pelos animais estavam de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pelo “US National Institutes of Health” (NIH publication No 85-23, revisado em 1996) e com a Lei Arouca (Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008).

Todos os protocolos e procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (Protocolo de Pesquisa número 182/13).

3.2 Descarte dos Animais

Os animais foram descartados segundo normas estabelecidas nesta Faculdade de Medicina da USP, pelo Grupo Técnico de Resíduos, como relatado abaixo:

A FMUSP gera resíduos dos grupos A, B, C, D e E classificados pelas Legislações ANVISA e CONAMA.

As carcaças dos animais utilizadas em pesquisa e ensino fazem parte do grupo A. Após sua segregação e identificação, o gerador solicita a retirada pelo sistema “disque carcaça”. Todas as carcaças são relacionadas e acondicionadas em câmara fria no Abrigo de Resíduos; o veterinário responsável emite o laudo e documento de Movimentação de Transporte de Resíduos – MTR liberando as carcaças para recolhimento, que ocorre três vezes por semana pela LIMPURB, para tratamento e disposição final.

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com o protocolo a que foram submetidos (n = 8 para cada grupo):

1. **SAL**: Inalações com solução salina estéril (NaCl 0,9%);
2. **SAL+rBmTI-A**: Inalação com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e tratamento com rBmTI-A.
3. **OVA**: Inalações com solução de ovoalbumina;
4. **OVA+rBmTI-A**: Inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com rBmTI-A;

3.4 Protocolo de Sensibilização por Ovoalbumina (OVA)

Para produzir o modelo de inflamação pulmonar, o antígeno ovoalbumina foi injetado via intraperitoneal para induzir sensibilização sistêmica e o mesmo antígeno foi administrado pelas vias aéreas, o foco do processo inflamatório, por aerossol.

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve a duração de 29 dias. Os camundongos receberam, por via intraperitoneal (i.p.), solução de 50 µg de ovoalbumina grau III (Sigma - Aldrich) adsorvida em 6 mg de Hidróxido de Alumínio - Alúmen (Pepsamar®, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) em um volume total de 0,2 mL, nos dias 0 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 (Pulmoclear II, Soniclear, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% (solução salina) na concentração de 10 mg/mL (1%), por 30 minutos. Ao mesmo tempo, o Grupo Controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alúmen) (6 mg) por via intraperitoneal (i.p.) e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9%, por 30 minutos.

3.5 Extração e Purificação do rBmTI-A

O inibidor rBmTI-A é membro da família do inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI)-Kunitz. Ele foi purificado no laboratório do Centro de Ciências Naturais e Humanas, da Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil, pelo grupo do Prof. Dr. Sergio D. Sasaki.

A clonagem do inibidor recombinante rBmTI-A utilizado nesse projeto, foi realizada baseada nessa sequência do DNA que codifica o BmTI-A (*Figura 3*).

E	A	Y	V	S	Q	P	H	V	N	P	F	A	<u>C</u>	Y	V	P	P	D	Q
G	P	C	R	A	S	I	P	R	Y	Y	F	D	N	D	T	Q	T	C	K
E	F	T	Y	G	G	C	E	G	N	P	N	N	Y	E	T	D	E	Q	C
K	A	S	<u>C</u>	K	P	E	T	E	Y	E	A	K	<u>C</u>	L	A	R	P	E	S
G	P	C	L	A	Y	M	P	M	W	A	Y	D	A	K	L	G	Q	C	V
K	F	I	Y	G	G	C	D	G	N	D	N	K	Y	P	T	K	E	K	C
L	N	S	<u>C</u>	K	K	S													

Figura 3. Sequência do inibidor rBmTI-A. As regiões de cada domínio Kunitz-BPTI delimitadas pelas cisteínas limítrofes estão sublinhadas. Aminoácidos da posição P1 do sítio reativo estão assinalados em vermelho. Análise usando o programa NetNGlyc 1.0 Server acessado pelo endereço <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> indica o potencial de glicosilação da asparagina, destacada em azul.

3.5.1 Expressão do Inibidor Recombinante rBmTI-A

O gene do inibidor recombinante rBmTI-A foi clonado de biblioteca de cDNA de intestino do carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus*, através da realização da construção do vetor recombinante rBmTI-A/pPIC9K. As colônias para expressão foram inoculadas em 25mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM pH 6,0, YNB 1,34%, biotina 40 µM e glicerol 1%), em frasco Erlenmeyer e mantidas sob agitação a 270 rpm e 28°C. O crescimento de leveduras foi acompanhado por leitura de OD600 até se obter um valor entre 2,0 e 6; essa etapa compreende um período de 30 a 35 horas. A amostra foi então centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular suspenso em meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de

potássio 100 mM pH6,0, YNB 1,34%, biotina 40 μ M e metanol 0,5%). A quantidade do meio BMMY foi sendo adicionada até que o valor de OD600 fosse igual a 1,0. O volume foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 1L e incubado sob agitação constante a 270 rpm, temperatura de 28°C. A indução da expressão proteica foi realizada por adição a cada 24 horas de metanol para uma concentração final de 0,05%. Antes de cada indução, uma alíquota da cultura foi retirada para o acompanhamento dos níveis de expressão. A expressão foi conduzida por um tempo total de 93 horas. Após a expressão, o material foi dialisado contra solução de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 2mM KH_2PO_4). Após a diálise, o material foi centrifugado durante 30 minutos, 4°C, 6000 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -20°C e as células foram suspensas e armazenadas em refrigerador (4°C). Do sobrenadante foi coletada uma alíquota de 1 mL (Sasaki e Tanaka, 2008; Soares et al., 2016).

3.5.2 Purificação do Inibidor Recombinante rBmTI-A

O meio de cultura, armazenado a -20°C, foi descongelado e centrifugado a 3500 rpm com temperatura controlada a 10°C. O rBmTI-A foi purificado utilizando cromatografia de afinidade com o uso de uma coluna tripsina-Sepharose, equilibrada com tampão TrisHCl 0,05 M, pH 8,0. Foram aplicados, em frações, 20 mL de amostra na coluna. Logo após, o tampão TrisHCl 0,05 M contendo NaCl 0,2 M, pH 8,0 foi passado pela coluna até que o material coletado atingisse a leitura de 0,05 de absorbância em 280 nm, leitura realizada em espectrofotômetro. Em seguida, o material foi eluído utilizando a solução de KCl/HCl 0,5 M pH 2,0. O líquido eluído da coluna foi coletado em 20

tubos de ensaio, sendo que para cada amostra foi coletado o total de 2 mL, previamente contendo 0,1 mL de TrisHCl 1 M pH 8,0. Após a coleta dos tubos, as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro, 280 nm. As amostras com maior absorbância foram reunidas em “pool” e tiveram sua concentração e constantes inibitórias (K_i) determinadas (Sasaki e Tanaka, 2008; Soares et al., 2016).

3.5.3 Concentração da Amostra do Inibidor rBmTI-A

Para o procedimento foi utilizado o sistema de concentração de amostras Amicon Ultra, Ultracel 3K, Millipore. À amostra concentrada do inibidor rBmTI-A, volume de 1,6 mL, foi adicionado o volume de 10mL de tampão PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 e 2 mM KH_2PO_4). O material foi centrifugado por 50 minutos, 3000 rpm. Este procedimento foi repetido por 4 vezes consecutivas. O material foi separado para os procedimentos experimentais e para estoque (Sasaki e Tanaka, 2008; Soares et al., 2016).

3.6 Protocolo de Tratamento com rBmTI-A

Para a realização deste tratamento, os animais foram anestesiados através da aplicação intramuscular de Xylazina (5 mg/Kg) e Ketamina (40 mg/Kg).

A fim de determinar os efeitos terapêuticos do inibidor de serinoproteases rBmTI-A (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor), os camundongos foram tratados através de instilação intranasal, nos dias da primeira e da última inalação de ovoalbumina (dias 22 e 28), e sempre 2 horas

após a inalação conforme o protocolo (*Figura 4*). Cada dose de rBmTI-A era de 35,54 pmol em 50 µL de solução salina, totalizando 71,08 pmol (Lourenço et al., 2014).

O procedimento da instilação nasal já foi utilizado em diversas pesquisas neste Laboratório de Terapêutica Experimental I (LIM-20) e é um método consagrado pela literatura. Com o auxílio de uma pipeta e ponteira, foi mensurada a quantidade da substância a ser instilada e, em seguida, gotejada no nariz do animal, que era segurado por profissional treinado, pelo dorso.

Os grupos controle (grupos Solução Salina - SAL) passaram pelos mesmos procedimentos, no entanto, receberam instilação nasal de solução salina (0,9% NaCl).

Para esta etapa do protocolo, os animais foram retirados, em suas respectivas baias, do Biotério do LIM-20 e alocados no laboratório, aonde receberam a instilação intranasal. Após a instilação, os animais retornaram às suas baias de origem e foram mantidos sob observação de um profissional treinado, por aproximadamente 1 hora, para só então, retornarem ao biotério, aonde receberam os cuidados já citados.

Os estudos de mecânica respiratória e histopatológicos foram realizados vinte e quatro horas (24 horas) após o último desafio antigênico, no dia 29.

Figura 4. Desenho do protocolo experimental e do tratamento com rBmTI-A. Nos dias 0 e 14, os animais dos grupos OVA e OVA+BmTI-A receberam injeção i.p. de ovoalbumina (50 µg/mL) e os animais dos grupos SAL e SAL+BmTI-A receberam injeção i.p. de solução salina 0,9%. Nos dias 22, 24, 26 e 28, os animais do grupo OVA receberam inalação com ovoalbumina e os animais do grupo controle inalação com solução salina. Nos dias 22 e 28 os animais dos grupo SAL e OVA receberam instilação nasal de solução salina e os dos grupos SAL+rBmTI-A e OVA+ BmTI+A instilação com o inibidor rBmTI-A. No dia 29 foi realizada a avaliação da mecânica pulmonar respiratória.

3.7 Medidas de Mecânica Respiratória

Após 30 dias do início do protocolo de sensibilização (vinte e quatro horas após o último desafio inalatório) e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina, os animais foram pesados, anestesiados com Tiopental (80 mg/Kg - i.p.) e traqueostomizados. Uma cânula de plástico (20 gauge, BD, MG, Brasil) foi inserida pelo orifício da traqueostomia, e fixada com fio de algodão ao redor da traqueia. Os animais foram, então, ventilados mecanicamente em um pletismógrafo de acrílico (120 ciclos por minuto, 10 mL/Kg), conectado a um ventilador Harvard 683 para pequenos animais (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA). Os sinais de pressão traqueal e o volume pulmonar 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 elastância e resistência do sistema respiratório foram calculados através da equação do movimento do sistema respiratório: $Ptr(t) = Rrs.V'(t) + Ers.V(t)$. Onde: t é tempo; Ptr é pressão traqueal; Rrs é resistência do sistema respiratório; Ers é elastância do sistema respiratório; V' é fluxo aéreo e V é o volume pulmonar. Foram calculados os valores de Rrs e Ers basais e máximos após a administração de aerossol de metacolina (3, 30 e 300 mg/mL, por 1 minuto - Curva Dose-Resposta).

Figura 5. Esquema demonstrando realização da mecânica pulmonar respiratória: Os animais foram colocados em um pletoresígrafo de acrílico e conectados a um ventilador mecânico (120 ciclos por minuto, 10 mL/Kg), um sistema de inalação conectado ao ventilador liberava doses de metacolina (3, 30, 300mg/mL, por 1 minuto cada). Os sinais de pressão traqueal e o volume pulmonar foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão, convertidos por placa analógica digital. Através da equação do movimento onde: Fr – frequência respiratória, VC – volume corrente, (t) – tempo, Ptr – pressão traqueal, Rrs – resistência do sistema respiratório, Ers – elastância do sistema respiratório, V' – fluxo de ar e V – volume do pulmão, foram obtidos os valores de Ers e Rrs .

3.8 Avaliação do Fluido do Lavado Broncoalveolar

Após a mecânica pulmonar respiratória, foi realizada a exsanguinação do animal. Em seguida, foi inserida uma cânula traqueal que foi conectada a

um sistema composto por uma torneira de três vias, uma seringa de 1 mL e uma seringa de 3 mL.

A coleta do fluido do lavado broncoalveolar foi realizada através da lavagem dos pulmões com três injeções de 0,5 mL de PBS pela da cânula traqueal. Após a coleta, o material foi processado para análise microscópica. Primeiramente, o fluido recolhido foi centrifugado a 800 rotações por minuto (rpm), durante dez minutos, a 4°C.

3.8.1 Contagem Total de Células

O botão celular foi ressuspendido em 0,3 mL de soro fisiológico estéril 0,9%. Desta solução foi retirado 20 µl para câmara de *Neubauer*. Na câmara foram contadas as células dos quatro quadrantes. A soma desse resultado foi corrigida pelo volume de soro fisiológico (0,3 mL), sendo o resultado multiplicado por 10^4 , gerando o resultado final, que é o número de células totais, segundo a fórmula:

$$\frac{L1+L2+L3+L4}{4} \times 0,3 \times 10^4 \text{ cél/mL (Figura 6).}$$

Figura 6. Esquema da Câmera de *Neubauer* acoplada a um microscópio, aonde foram contadas as células dos quatro quadrantes. O número de células totais deu-se a partir da utilização da fórmula demonstrada na figura.

3.8.2 Contagem Diferencial de Células

Foram utilizados 100 µl do sobrenadante, que foi colocado na centrífuga (*Cytospin*), a 450 rpm, durante 10 minutos para a obtenção das lâminas, que foram coradas com o reagente rápido Diff Quick. A contagem diferencial das células foi determinada em 300 células/lâmina, em campos aleatoriamente selecionados e seguiram os critérios hemocitológicos para diferenciação de eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, com o auxílio de um microscópio óptico, em objetiva de imersão de 1000x (*Figura 7*). Para obtenção do número absoluto de cada população celular no FLBA, as porcentagens foram multiplicadas pelo número total de células encontradas no volume.

Figura 7. Esquema representativo da análise para contagem diferencial das células a partir da utilização de um microscópio óptico com objetiva de imersão e aumento de 1000x.

3.9 Determinação da Concentração de Citocinas por Citometria de Fluxo (*Cytometric Bead Array – CBA*)

A dosagem de citocinas no FLBA foi realizada através do método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando-se os Kits CBA Mouse Enhanced Sensitivity Flex Set (BD Pharmingen) específicos para as citocinas: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A e INF- γ , de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram incubadas com microesferas de captura com diferentes intensidades de fluorescência revestidas com um anticorpo de captura específico para cada citocina. Logo após, ocorreu uma segunda incubação com anticorpos de detecção de alta sensibilidade marcados com ficoeritrina (PE), que emite sinal fluorescente proporcional à quantidade de proteína.

Após as incubações, foi acrescentado 1mL da solução de lavagem e o material foi centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi descartado e em 300 µL do tampão de lavagem as amostras foram ressuspensas para análise dos complexos no citômetro de fluxo (LSRFortessa - BD Biosciences) e os resultados foram gerados pelo programa BD FCAPArray 3.0 (BD Biosciences) em formato gráfico e tabular.

Limites de detecção de acordo com o fabricante: IL-4 (3,7 fg/mL), IL-5 (12,5 fg/mL), IL-10 (62,1 fg/mL), IL-13 (67,6 fg/mL), IL-17A (20,5 fg/mL), INF-γ (24,8 fg/mL).

3.10 Estudo Morfométrico

Após avaliação da mecânica do sistema respiratório, exsanguinação e retirada do fluido do lavado broncoalveolar, a caixa torácica dos animais foi aberta e o sistema cardiopulmonar foi retirado em bloco. O pulmão esquerdo foi fixado com formol a 10% e após vinte e quatro horas, transferido para etanol a 70%. Ao fim da fixação, o pulmão foi cortado em seu maior eixo e submetido a processamento para o emblocamento do tecido em parafina, para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura corados com LUNA (para análise de eosinófilos), Picro-Sírius (para análise das fibras colágenas), Resorcina-

Fucsina de Weigert (para análise das fibras elásticas) e lâminas em branco (para avaliação imuno-histoquímica).

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico comum (*CH30, Olympus, Japão*), sendo avaliados aproximadamente três campos de três a cinco vias aéreas de cada animal, aleatoriamente selecionadas por animal.

Previamente, vários autores já demonstraram que esta técnica de avaliação morfométrica é reprodutível e adequada (Tiberio et al., 1997; Leickmaldonado et al., 2004; Weibel, 2010; Pigati et al., 2015).

3.10.1 Quantificação de Eosinófilos

Para a avaliação dos eosinófilos, foi empregada a técnica de LUNA, que identifica os grânulos de eosinófilos (Watanabe et al., 2004). O tecido estudado foi retirado de regiões periféricas dos pulmões. Foi utilizada a técnica de contagem de pontos (Weibel, 1963) com o auxílio de um retículo, de 50 retas e 100 pontos, acoplado à ocular do microscópio e sobreposto ao tecido ($10^4 \mu\text{m}^2$ de área total). O retículo foi posicionado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio (*Figura 8*). Foram quantificadas as células positivas que infiltravam a parede da via aérea, entre o epitélio brônquico e a adventícia, contadas em aumento de 1.000x. Foi obtida a relação entre o número de pontos que incidiam nas células positivas dentro do campo do retículo, dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido presente nesse mesmo campo do retículo. Foram analisados de 10 a 15 campos por corte e o número de células expresso por unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$).

Figura 8. Fotomicrografia exemplificando o posicionamento do retículo na via aérea, para realização da técnica de contagem de pontos.

3.10.2 Avaliação das Imagens para Medida de Densidade Óptica

A medida da densidade óptica foi o método utilizado para a análise morfométrica de fibras colágenas e elásticas na parede das vias aéreas. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio *Leica DM4000B* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) e uma câmera digital *Leica DFC420* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) conectados a um computador através do software *Leica Qwin* (*Leica Microsystems, Cambridge, Inglaterra*), que adquiria as imagens. Foram fotografadas 10 vias aéreas com ampliação de 400x.

As imagens foram processadas pelo software *ImageProPlus* (*Media Cybernetics, Bethesda, MD*), que permite informar um limiar de tons de cores (“*threshold*”) que representam as áreas positivas, de modo a quantificar a área pré-determinada. Foram definidos dois limiares binários de cores, um para o cálculo das fibras (de acordo com a coloração) e outro para as vias aéreas (*Figura 9*). Assim, a proporção de fibras de colágenas ou elásticas por área de

vias aéreas foi quantificada. Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva (fração de volume).

Figura 9. Exemplo da sequência de procedimentos realizados no software *ImageProPlus* para quantificação de fibras colágenas e elásticas. A: Foto da via aérea; B: Seleção da área a ser analisada; C: Áreas positivas de modo a quantificar as fibras; D: Área total do espaço selecionado.

Quantificação de Fração de Volume de Fibras Colágenas

Para a contagem de fibras colágenas, os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram corados por 1 hora com Picro-Sírius (*Direct Red 80*, C.I. 35780, *Aldrich, Milwaukee*, WI, EUA), à temperatura ambiente e posteriormente lavados 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. Por fim, as lâminas foram montadas. A leitura foi realizada no analisador de imagens e os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas, conforme descrito no item 3.10.2.

Quantificação de Fração de Volume das Fibras Elásticas

Para o estudo das fibras elásticas, tanto das propriamente ditas quanto das eulanínicas, os cortes foram desparafinizados e hidratados em álcool 95°. Posteriormente foram corados pela Resorcina-Fucsina por 1 hora e lavados em água corrente por 5 minutos. Foram então realizadas duas trocas de álcool 70° durante 10 minutos, sendo esta etapa a da diferenciação das fibras. Em seguida foram desidratados, diafanizados e posteriormente montados. A leitura foi realizada no analisador de imagens por medida de densidade óptica e os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas, conforme descrito no item 3.10.2.

3.11 Avaliação Imuno-histoquímica

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada para detecção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, MMP-9 e TIMP-1. As lâminas com cortes histológicos pulmonares foram previamente preparadas com 3-aminopropil-trietoxissilano Silano (*Sigma*). Inicialmente as lâminas foram submetidas à desparafinização (Xilol 60°C por 5 minutos) e hidratação (Xilol; Etanol 95% e Etanol 70%). Posteriormente foram lavadas com água corrente, água deionizada e PBS, sendo então submetidas aos seguintes procedimentos:

- Recuperação antigênica: para detecção da expressão de IL-05, IL-10, IL-13, MMP-9 e TIMP-1 as lâminas foram imersas em solução de Citrato com pH 6,00 (*Target Retrieval Solution, DAKO, California, EUA*) e expostas ao vapor em panela de pressão (*Dako Cytomation, California, Inc.*) por 1 minuto à 125°C. Para detecção da expressão de IL-04 e IL-17 as lâminas foram imersas em solução de Citrato com pH 9,00 (*Target Retrieval Solution, DAKO, California, EUA*) em panela à vapor por 50 minutos à 125°C. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água corrente.
- Bloqueio de Peroxidase Endógena e Ligações Inespecíficas: O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado com metanol e água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (10 minutos), seguido de lavagem com água corrente e água deionizada (3 minutos em ambas). Posteriormente as lâminas foram lavadas em solução de PBS (3 minutos).
- Incubação com Anticorpo Primário: Os anticorpos primários foram diluídos em solução de BSA (*Bovine serum albumin*) e aplicados sobre cada lâmina. A Tabela 2 mostra os anticorpos utilizados e suas respectivas diluições. Em seguida, as lâminas foram incubadas *overnight* em uma câmara úmida em geladeira à 4°C.

Anticorpo Primário	Diluição	Código	Anticorpo Secundário
IL-4	1:600	sc-1260	Anti-goat
IL-5	1:100	sc-7887	Anti-rabbit
IL-10	1:500	sc-8126	Anti-mouse
IL-13	1:700	sc-393365	Anti-mouse
IL-17	1:800	sc-7294	Anti-mouse
MMP-9	1:500	sc-6840	Anti-goat
TIMP-1	1:100	sc-5538	Anti-rabbit

[sc: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., Califórnia, EUA]

Tabela 2: Descrição dos anticorpos e diluições utilizados na Técnica de Imuno-histoquímica.

- Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS (3 vezes de 3 minutos) e incubadas com anticorpo secundário *ABCkit Vectastain* (Vector Elite) - PK-6105 (anti-goat) para IL-4, IL-13; (anti-rabbit) para IL-5 e MMP-9 e (anti-mouse) para IL-10, IL-17 e TIMP-1, por 30 minutos em estufa à 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas novamente em PBS (3 vezes de 3 minutos) e incubadas com o Complexo conjugado com peroxidase *ABCkit Vectastain* (Vector Elite) por 30 minutos em estufa a 37°C.
- Revelação: Após lavagem das lâminas com PBS (3 vezes de 3 minutos), foi realizada a revelação pelo cromógeno diaminobenzidina (DAB) (*DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca*). Após, as lâminas foram lavadas com água corrente e água destilada (10 e 2 minutos, respectivamente).
- Contracoloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Alemanha*)

durante 10 segundos e lavadas com água corrente (5 minutos). Após a limpeza, foram desidratadas (Etanol absoluto, 95% e 70%), diafanizadas (Xilol por 15 minutos) e montadas com as lamínulas para posterior microscopia.

As maneiras pelas quais os resultados da quantificação dessas células foram determinados estão descritos no item “Estudo Morfométrico”.

3.12 Avaliação da Atividade Proteolítica do Homogenato Pulmonar

O pulmão direito foi homogeneizado em PBS (600µL), utilizando-se “beads” de metal, conforme recomendações do fabricante (*Powerlyzer, MoBio Laboratories Inc, USA*).

O homogenato pulmonar foi utilizado no ensaio enzimático para análise da atividade proteolítica de MMP-1, MMP-9 e proteases tripsina-*like* no tecido pulmonar conforme o protocolo a seguir:

Para análise da atividade de MMP-1 e MMP-9 foi realizada a incubação de 10 µL da amostra (homogenato pulmonar) com 2 µL do substrato fluorogênico de MMP-1/ MMP-9 (*MMP-1/MMP-9 substrate – Calbiochem*) e 88 µL de tampão (TrisHCl 0,1M, NaCl 0,15M e Triton X-100 0,1M), pH 8,0. Para análise da atividade proteolítica de tripsina-*like*: 10 µL de amostra (homogenato pulmonar), 4 µL do substrato fluorogênico tripsina-*like* (*Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, Hydrochloride - Calbiochem*) e 86 µL de tampão (TrisHCl 0,1M, NaCl 0,15M e Triton X-100 0,1M), pH 8,0. Após 20 minutos de incubação a 37°C, foram realizadas as leituras por 30 minutos (com intervalo de 5 minutos cada) em espectrofotômetro (*Biotek – Synergy HT*), utilizando os seguintes parâmetros: Sensitividade 65; “Optic exposition – Top”; Comprimento de ondas 380/20 (excitação) e 460/40 (emissão).

3.13 Análise Estatística

Todos os dados são representados por média $\pm$ erro padrão (EP) e os gráficos são apresentados na forma de barras. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise de variância simples (ANOVA) seguido pelo método de *Holm-Sidak* para comparações múltiplas. Todas as análises foram realizadas usando o software *SigmaPlot 12.0* (*Systat Software*, Califórnia, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Mecânica Respiratória

4.1.1 Resposta Máxima da Elastância do Sistema Respiratório

Na avaliação da mecânica respiratória, a *Figura 10A* representa os valores da elastância do sistema respiratório (Ers). Foi observado o aumento da Ers no grupo OVA ($97,06 \pm 14,45 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$) comparado aos grupos controles (SAL: $56,96 \pm 1,45 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$; SAL+rBmTI-A: $52,28 \pm 3,82 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$, $p < 0,001$). O grupo tratado com o inibidor de serinoproteases rBmTI-A (OVA+rBmTI-A: $67,41 \pm 5,81 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1}$) apresentou redução comparado ao grupo OVA não tratado ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

A *Figura 10C* representa a curva dose-resposta da elastância do sistema respiratório (Ers) em resposta ao desafio com metacolina (3, 30 e 300 mg/mL) dos quatro grupos experimentais.

4.1.2 Resposta Máxima da Resistência do Sistema Respiratório

Conforme ilustrado na *Figura 10B*, a resistência do sistema respiratório (Rrs) também se mostrou aumentada no grupo OVA ($1,6 \pm 0,13 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}$) em comparação com os grupos controles (SAL: $1,14 \pm 0,06 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}$; SAL+rBmTI-A: $1,13 \pm 0,10 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}$, $p < 0,05$). No grupo tratamento houve atenuação expressiva dessa resposta pulmonar (OVA+rBmTI-A: $1,0 \pm 0,10 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{s}$) comparado ao grupo OVA ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

A Figura 10D representa a curva dose-resposta da resistência do sistema respiratório (Rrs) em resposta ao desafio com metacolina (3, 30 e 300 mg/mL) dos quatro grupos experimentais.

Figura 10. (A) Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da resposta máxima da elastância do sistema respiratório (Ers) após o desafio com metacolina (300 mg/mL) dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. (B) Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da resposta máxima da resistência do sistema respiratório (Rrs) após o desafio com metacolina (300 mg/mL) dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA. (C) Gráfico de linhas mostrando a curva dose-resposta da elastância do sistema respiratório (Ers) em resposta ao desafio com metacolina (3, 30 e 300 mg/mL) dos quatro grupos experimentais. (D) Gráfico de linhas mostrando a curva dose-resposta da resistência do sistema respiratório (Rrs) em relação ao desafio com metacolina (3, 30 e 300 mg/mL) dos quatro grupos experimentais.

4.2 Estudo Morfométrico

4.2.1 Avaliação do Infiltrado Eosinofílico

O estudo morfométrico (*Figura 11A*), mostrou que no grupo OVA houve aumento do infiltrado eosinofílico nas vias aéreas (OVA: $8,22 \pm 0,79$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos controles (SAL: $1,13 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL+rBmTI-A: $2,42 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Comparado ao grupo OVA, o grupo de animais sensibilizados e tratado com inibidor apresentou redução de eosinófilos nas vias aéreas (OVA+rBmTI-A: $5,82 \pm 0,63$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). O grupo OVA+rBmTI-A foi significativamente diferente dos grupos controles ($p < 0,001$).

4.2.2 Avaliação da Fração de Volume das Fibras Colágenas

Na avaliação da fração de volume das fibras colágenas das vias aéreas representada na *Figura 11B*, houve aumento da porcentagem das fibras colágenas no grupo OVA ($17,45 \pm 0,87\%$) comparado aos grupos controles (SAL: $10,24 \pm 0,77\%$; SAL+rBmTI-A: $12,51 \pm 0,72\%$). O tratamento com o inibidor rBmTI-A atenuou significativamente esta resposta nos animais sensibilizados (OVA+rBmTI-A: $10,27 \pm 0,66\%$). $p < 0,001$ para todas as comparações. Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.2.3 Avaliação da Fração de Volume das Fibras Elásticas

Conforme ilustrado na *Figura 11C*, também foi observado aumento de volume das fibras elásticas no grupo que recebeu ovoalbumina (OVA: $0,64 \pm 0,05\%$) comparado aos grupos controles (SAL: $0,48 \pm 0,05\%$; SAL+rBmTI-

A: $0,46 \pm 0,03\%$). O grupo de animais sensibilizados tratados com rBmTI-A diminuiu a porcentagem de fibras elásticas (OVA+rBmTI-A: $0,48 \pm 0,03\%$) quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$ para todas as comparações). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

Figura 11. (A) Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão dos valores da densidade de eosinófilos nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. **(B)** Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA. **(C)** Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA.

4.3 Avaliação Imuno-histoquímica

4.3.1 Expressão de IL-4 nas Vias Aéreas

Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si na expressão de IL-4 nas vias aéreas conforme a representado na *Figura 12A*.

4.3.2 Expressão de IL-5 nas Vias Aéreas

A *Figura 12B* mostra o número células positivas para IL-5 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-5 no grupo OVA ($9,61 \pm 0,83$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação aos controles (SAL: $3,28 \pm 0,46$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, SAL+rBmTI-A: $3,53 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Foi observado redução da expressão de IL-5 no grupo sensibilizado e tratado com o inibidor rBmTI-A (OVA+rBmTI-A: $3,32 \pm 0,75$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.3.3 Expressão de IL-10 nas Vias Aéreas

A concentração de IL-10 nas vias aéreas está ilustrada na *Figura 12C*. Foi observado aumento de IL-10 no grupo OVA ($2,94 \pm 0,53$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação aos controles (SAL: $0,0 \pm 0,0$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, SAL+rBmTI-A: $0,29 \pm 0,20$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve diminuição na expressão de IL-10 no grupo sensibilizado e tratado com o inibidor de serinoprotease (OVA+rBmTI-A: $0,125 \pm 0,07$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.3.4 Expressão de IL-13 nas Vias Aéreas

A *Figura 12D* representa a expressão de IL-13 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-13 no grupo OVA ($3,31 \pm 0,38$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação aos controles (SAL: $1,08 \pm 0,23$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,001$; SAL+rBmTI-A: $1,68 \pm 0,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). O grupo sensibilizado e que recebeu tratamento com rBmTI-A apresentou redução da concentração dessa citocina (OVA+rBmTI-A: $1,43 \pm 0,27$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.3.5 Expressão de IL-17 nas Vias Aéreas

A concentração de IL-17 nas vias aéreas está ilustrada na *Figura 12E*. Foi observado aumento de IL-17 no grupo OVA ($3,15 \pm 0,32$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação aos controles (SAL: $1,10 \pm 0,28$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, SAL+rBmTI-A: $1,40 \pm 0,28$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve diminuição na expressão de IL-17 no grupo sensibilizado e tratado com o inibidor de serinoprotease (OVA+rBmTI-A: $1,69 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.3.6 Expressão de MMP-9 nas Vias Aéreas

A *Figura 12F* mostra o número células positivas para MMP-9 nas vias aéreas. Houve aumento de MMP-9 no grupo OVA ($11,65 \pm 1,02$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação aos controles (SAL: $4,51 \pm 0,51$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, SAL+rBmTI-A: $4,70 \pm 0,71$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve atenuação dessa resposta no grupo sensibilizado a tratado com o inibidor rBmTI-A (OVA+rBmTI-

A: $8,21 \pm 1,49$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p<0,05$) e aumento do grupo OVA+rBmTI-A em relação ao grupo SAL ($p<0,05$).

4.3.7 Avaliação da Expressão de TIMP-1

A Figura 12G mostra o número células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas. Houve aumento de TIMP-1 no grupo OVA (OVA: $12,51 \pm 1,21$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação aos controles (SAL: $5,36 \pm 0,58$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, SAL+rBmTI-A: $7,06 \pm 0,66$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p<0,001$). Houve diminuição na expressão de TIMP-1 no grupo (OVA+rBmTI-A: $9,01 \pm 0,87$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p<0,05$) e aumento do grupo OVA+rBmTI-A em relação ao grupo SAL ($p<0,05$).

Figura 12. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da expressão de citocinas e metaloproteases nas vias aéreas dos quatro grupos experimentais. **(A)** IL-4: Não houve diferença significativa entre os grupos. **(B)** IL-5: * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA. **(C)** IL-10: * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA. **(D)** IL-13: * $p < 0,001$ em comparação ao grupo SAL, # $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,001$ em relação ao grupo OVA. **(E)** IL-17: * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. **(F)** MMP-9: * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, # $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. **(G)** TIMP-1: * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, # $p < 0,05$ em comparação ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA.

4.4 Avaliação Qualitativa

As *Figuras 13 a 20* expõem as fotomicrografias das vias aéreas dos quatro grupos experimentais corados com Luna para detecção de eosinófilos (*Figura 13*); Picro-Sírius para a detecção do conteúdo de colágeno (*Figura 14*); Resorcina-Fucsina de Weigert para a detecção do conteúdo de fibras elásticas (*Figura 15*) e imuno-histoquímica para expressão de citocinas e metaloproteinases (*Figuras 16 - 22*).

Figura 13. Fotomicrografias representativas de eosinófilos nas vias aéreas.

Figura 14. Fotomicrografias representativas da fração volume de fibras colágenas nas vias aéreas.

Figura 15. Fotomicrografias representativas da fração de volume de fibras elásticas nas vias aéreas.

Figura 17. Fotomicrografias representativas da expressão de células IL-5 positivas nas vias aéreas.

Figura 18. Fotomicrografias representativas da expressão de células IL-10 positivas nas vias aéreas.

Figura 19. Fotomicrografias representativas da expressão de células IL-13 positivas nas vias aéreas.

Figura 20. Fotomicrografias representativas da expressão de células IL-17 positivas nas vias aéreas.

Figura 21. Fotomicrografias representativas da expressão de células MMP-9 positivas nas vias aéreas.

Figura 22. Fotomicrografias representativas da expressão de células TIMP-1 positivas nas vias aéreas.

4.5 Células Inflamatórias no Fluido do Lavado Broncoalveolar

4.5.1 Células Totais no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A *Figura 23A* representa o número de células totais no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA). Houve aumento das células totais no grupo OVA ($12,84 \pm 2,75 \times 10^4$ células/mL) em comparação aos grupos controles (SAL: $4,87 \pm 0,43 \times 10^4$ células/mL; SAL+rBmTI-A: $4,82 \pm 0,74 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A ($9,95 \pm 2,06 \times 10^4$ células/mL).

4.5.2 Polimorfonucleares no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A *Figura 23B* representa o número de células polimorfonucleares no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA). Houve aumento dos polimorfonucleares no grupo OVA ($9,78 \pm 2,42 \times 10^4$ células/mL) em comparação aos grupos controles (SAL: $0,38 \pm 0,13 \times 10^4$ células/mL; SAL+rBmTI-A: $0,40 \pm 0,16 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,001$). No grupo sensibilizado e tratado (OVA+rBmTI-A: $3,97 \pm 0,88 \times 10^4$ células/mL) foi observada redução dessas células inflamatórias em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.5.3 Linfócitos no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A *Figura 23C* representa o número de linfócitos no lavado broncoalveolar. Os linfócitos estavam aumentados no FLBA do grupo OVA ($0,34 \pm 0,1 \times 10^4$ células/mL) e OVA+rBmTI-A ($0,38 \pm 0,11 \times 10^4$ células/mL) comparados ao grupo controle SAL ($0,06 \pm 0,03 \times 10^4$ células/mL, $p < 0,05$). Não houve diferença

entre os grupos SAL+rBmTI-A ($0,25 \pm 0,05 \cdot 10^4$ células/mL), OVA e OVA+rBmTI-A.

4.5.4 Macrófagos no Fluido do Lavado Broncoalveolar

Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si na quantidade de macrófagos, conforme a representado na *Figura 23D*.

Figura 23. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da expressão de células inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar dos quatro grupos experimentais. **(A)** Células totais: * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A. **(B)** Células polimorfonucleares: * $p < 0,001$ em comparação aos grupos SAL e SAL+BmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. **(C)** Linfócitos: * $p < 0,05$ em comparação com o grupo SAL. **(D)** Macrófagos: Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.6 Quantificação das Citocinas no Fluido do Lavado Broncoalveolar (CBA)

4.6.1 IL-4 no Fluido do Lavado Broncoalveolar

Na avaliação das citocinas inflamatórias do FLBA pelo método CBA ilustrada na *Figura 24A*, observou-se que a concentração de IL-4 estava aumentada no grupo OVA ($628,82 \pm 139,44$ fg/mL) comparado aos grupos controles (SAL: 0,0 fg/mL e SAL+rBmTI-A: 0,0 fg/mL, $p < 0,05$). O grupo sensibilizado e tratado com o inibidor rBmTI-A (OVA+rBmTI-A: $470,77 \pm 168,86$ fg/mL) não teve redução desta resposta comparativamente ao grupo OVA.

4.6.2 IL-5 no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A *Figura 24B* representa a concentração de IL-5 no FLBA dos grupos experimentais. Houve aumento de IL-5 no FLBA do grupo OVA ($8433,39 \pm 1776,80$ fg/mL) comparado aos grupos controles (SAL: $37,30 \pm 6,05$ fg/mL; SAL+rBmTI-A: $91,57 \pm 13,38$ fg/mL, p). O grupo sensibilizado e que recebeu tratamento com rBmTI-A apresentou redução da concentração dessa citocina (OVA+rBmTI-A: $3337,21 \pm 649,38$ fg/mL) quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$ para todas as comparações). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.6.3 IL-10 no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A quantidade de IL-10 encontrada no FLBA está ilustrada na *Figura 24C*. O grupo sensibilizado e que recebeu o tratamento com o inibidor de serinoprotease rBmTI-A atenuou esta resposta quando comparado ao grupo OVA (OVA+rBmTI-A: $4340,59 \pm 631,93$ fg/mL, OVA $13207,63 \pm 2463,73$ fg/mL;

$p < 0,05$). Os grupos controles (SAL: $5324,85 \pm 1900,49$ fg/mL e SAL+rBmTI-A: $5445,71 \pm 1423,50$ fg/mL) não apresentaram diferença em relação aos grupos OVA e OVA+ rBmTI-A.

4.6.4 IL-13 no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A concentração de IL-13 no FLBA está representada na *Figura 24D*. Houve aumento da concentração IL-13 no grupo OVA ($2826,23 \pm 748,70$ fg/mL) comparado aos grupos controles (SAL: $17,5 \pm 17,5$ fg/mL; SAL+rBmTI-A: $17,62 \pm 17,62$ fg/mL, $p < 0,05$). O grupo sensibilizado e tratado com o inibidor de serinoprotease diminuiu significativamente esta resposta (OVA+rBmTI-A: $599,89 \pm 315,8$ fg/mL) comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.6.5 IL-17A no Fluido do Lavado Broncoalveolar

A concentração de IL-17A nos grupos experimentais está ilustrada na *Figura 24E*. Foi observado aumento da concentração de IL-17A no FLBA do grupo OVA ($361,21 \pm 65,2$ fg/mL) em comparação aos grupos controles (SAL: $19,84 \pm 19,84$ fg/mL; SAL+rBmTI-A: $102,27 \pm 51,09$ fg/mL, $p < 0,05$). O grupo sensibilizado e que recebeu tratamento com o inibidor teve redução da concentração de IL-17A (OVA+rBmTI-A: $106,79 \pm 40,29$ fg/mL) quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

4.6.6 INF- γ no Fluido do Lavado Broncoalveolar

Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si na expressão de INF- γ , conforme a representação na *Figura 24F*.

Figura 24. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da concentração de citocinas no fluido do lavado broncoalveolar. **(A)** IL-4: * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A. **(B)** IL-5: * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. **(C)** IL-10: * $p < 0,05$ em comparação ao grupo OVA. **(D)** IL-13: * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,05$ em comparação ao grupo OVA. **(E)** IL-17A: * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,05$ em comparação ao grupo OVA. **(F)** INF- γ : Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.7 Avaliação da Atividade Proteolítica no Homogenato Pulmonar

4.7.1 Atividade Proteolítica de MMP-1 e MMP-9 no Homogenato Pulmonar

Os grupos não apresentaram diferença significativa entre si na atividade proteolítica de MMP-1 e MMP-9 conforme a representação na *Figura 25A*.

A *Figura 25C* representa a variação da atividade proteolítica de MMP-1 e MMP-9 em relação ao tempo nos quatro grupos experimentais.

4.7.2 Atividade Proteolítica de Tripsina-like no Homogenato Pulmonar

A atividade proteolítica de tripsina-like está representada na *Figura 25B*. Houve aumento da atividade de serinoproteases no grupo OVA ($3778,05 \pm 364,18$ RFU) comparado aos grupos controles (SAL: $2780,86 \pm 77,21$ RFU; SAL+rBmTI-A: $2845,15 \pm 71,12$ RFU, $p < 0,05$). O grupo sensibilizado e tratado com o inibidor de serinoprotease diminuiu significativamente esta atividade (OVA+rBmTI-A: $2880,58 \pm 167,05$ RFU) comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, SAL+rBmTI-A e OVA+rBmTI-A.

A *Figura 25D* representa a variação da atividade proteolítica de tripsina-like em relação ao tempo nos quatro grupos experimentais.

Figura 25. (A) Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da atividade proteolítica de MMP-1 e MMP-9 no homogenato pulmonar dos quatro grupos experimentais. **(B)** Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão da atividade proteolítica de tripsina-like no homogenato pulmonar dos quatro grupos experimentais. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos SAL e SAL+rBmTI-A, ** $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA. **(C)** Gráfico de linhas mostrando a variação da atividade proteolítica de MMP-1 e MMP-9 dos quatro grupos experimentais em relação ao tempo. **(D)** Gráfico de linhas mostrando a variação da atividade proteolítica de tripsina-like dos quatro grupos experimentais em relação ao tempo.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o efeito do inibidor de serinoprotease rBmTI-A, em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Demonstramos que o tratamento com o rBmTI-A reduziu a atividade proteolítica de tripsina-*like* no homogenato pulmonar. Este resultado associou-se à atenuação da hiper-responsividade das vias aéreas dos animais sensibilizados com ovoalbumina após o desafio com o broncoconstritor metacolina; à redução do influxo de eosinófilos no FLBA e nas vias aéreas; diminuição da expressão de citocinas inflamatórias de perfil Th2/Th17 (IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17) no FLBA e nas vias aéreas; atenuação da expressão de MMP-9 e TIMP-1 nas vias aéreas e diminuição do remodelamento da matriz extracelular, avaliado pela redução do conteúdo de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas.

Existem evidências de que o desequilíbrio entre proteases e seus inibidores possui papel importante no desenvolvimento da asma (Vignola et al., 1998; Berger et al., 1999; von Ehrenstein et al., 2004; Churg e Wright, 2005) e de forma mais evidente nos períodos de exacerbação (Yasui et al., 2003; Nishioka et al., 2008).

As serinoproteases são enzimas versáteis que regulam a inflamação e geralmente, estão envolvidas na produção de citocinas pró-inflamatórias e na ativação de células imunes (Soualmia e El Amri, 2018). Participam de várias fases do processo inflamatório, como indução da desgranulação de mastócito (He et al., 1998); migração de neutrófilos e eosinófilos e extravasamento microvascular (He e Walls, 1997); aumento da concentração de histamina nas vias aéreas (Molinari et al., 1996; Johnson et al., 1997); proliferação de

fibroblastos no pulmão e de células de músculo liso nas vias aéreas (Brown et al., 2002; Frungieri et al., 2002) e da produção de muco que está associada a altas taxas de mortalidade na asma grave (Saetta et al., 1991; Aikawa et al., 1992).

Diversas serinoproteases do tipo tripsina-*like* têm estado sido estudadas como ferramentas terapêuticas no tratamento de patologias como trombose, asma e DPOC (Liang e Bowen, 2016).

O inibidor de serinoproteases BmTI-a possui ação inibitória sobre a caliceína plasmática humana (HuPK), elastase neutrofílica e sobre a tripsina (Tanaka et al., 1999; Azzolini et al., 2003; Sasaki et al., 2004). Tais achados corroboram com nosso estudo, em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica observamos a redução da atividade enzimática de tripsina-*like* no homogenato pulmonar dos animais sensibilizados e tratados com o inibidor rBmTI-A, comparado ao grupo sensibilizado que não recebeu o inibidor. Esse resultado foi acompanhado da atenuação de diversas respostas inflamatórias, que têm sido associadas à atividade dessas serinoproteases na asma.

Pacientes com asma em fase de exacerbação apresentaram maior atividade amidolítica de HuPK comparado a indivíduos saudáveis e asmáticos controlados (Monteseirin et al., 1992). Em outro estudo, foi observado o aumento do pico de HuPK no FLBA de pacientes com inflamação crônica das vias aéreas e principalmente nos quadros de agudização, comparado a indivíduos saudáveis (Zhang et al., 1997). A participação da HuPK no processo inflamatório de patologias que acometem o sistema respiratório ocorre através na liberação de bradicinina nas células do epitélio pulmonar (Vergiliana et al., 2010). A bradicinina por sua vez pode estimular os pneumócitos tipo II a

liberarem citocinas inflamatórias que modulam a inflamação pulmonar (Koyama et al., 1998).

A elastase neutrofílica está associada à ruptura de fibras elásticas na asma, o que sugere sua importância no remodelamento das vias aéreas (Vignola et al., 1998). A tripsina estimula a resposta inflamatória imunológica inata (Reed, 2010). E possui atuação na contração e no remodelamento das vias aéreas em humanos (Chambers et al., 2001). O papel da elastase neutrofílica e da tripsina na asma fica ainda mais evidente na presença da deficiência de alfa-1 antitripsina, um conhecido inibidor de serinoproteases, que é capaz de inibir algumas enzimas como tripsina, elastase neutrofílica e protease-3 (Camelier et al., 2008). Apesar do nome, sua atividade inibitória é maior sobre a elastase neutrofílica, considerado seu principal inibidor (DeMeo e Silverman, 2004; Stoller e Aboussouan, 2005).

Alguns estudos afirmaram que indivíduos com deficiência de alfa-1 antitripsina estão mais propensos a desenvolver asma (Eden et al., 1997). Podem apresentar um maior grau de gravidade da doença e declínio da função pulmonar (Vignola et al., 1998; Eden et al., 2003), inclusive em crianças (von Ehrenstein et al., 2004). No entanto, outros estudos não encontraram nenhuma associação entre a deficiência desse inibidor com o desenvolvimento da asma (Tomashefski et al., 2004; Mousavi et al., 2013).

Os modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica em murinos têm sido amplamente utilizados por reproduzirem características importantes da resposta imune e inflamatória na asma (Pauwels et al., 1997; Nials e Uddin, 2008; Toledo et al., 2013). Os camundongos apresentam várias vantagens, devido ao baixo custo, ciclo reprodutivo rápido e com grande

número de filhotes por vez (Wills-Karp, 2000; Torres et al., 2005; Nials e Uddin, 2008; Gueders et al., 2009). Camundongos da linhagem *Balb/c*, utilizados em nosso modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica apresentam ainda boa resposta imunológica de perfil Th2 (Boyce e Austen, 2005; Fernandez-Rodriguez et al., 2008; Dos Santos et al., 2014) e boa reatividade à metacolina (Gueders et al., 2009).

A hiper-responsividade é uma das principais características da asma resultante da inflamação crônica das vias aéreas (GINA, 2017). Testes de provocação brônquica são utilizados para avaliar sua presença e auxiliar no diagnóstico de indivíduos que apresentam sinais e sintomas da asma (Brannan e Lougheed, 2012).

Modelos experimentais de inflamação alérgica crônica apresentaram elevação significativa da Ers e Rrs, quando submetidos à administração intravenosa de metacolina (Petak et al., 1997; Arantes-Costa et al., 2002; Gueders et al., 2009; Schutz et al., 2009). Devido a seu efeito broncoconstritor, a metacolina tem sido amplamente utilizada para documentar e quantificar a hiper-responsividade das vias aéreas (Cockcroft, 2010; Brannan e Lougheed, 2012).

Lourenço et al. (2014) já demonstraram em estudo prévio, que a administração do inibidor rBmTI-A teve tanto efeito protetor contra o desenvolvimento e progressão de enfisema pulmonar, quanto efeito de tratamento após a doença instalada, com diminuição do aumento dos espaços aéreos distais nos animais tratados comparados aos que não receberam tratamento. Como este foi o primeiro trabalho com animais que utilizou o rBmTI-A, e compararam o efeito do tratamento com uma dose de rBmTI-A de

35,54 pmol em 50 µL de solução salina e com duas doses dessa mesma concentração, sendo uma no início do protocolo de sensibilização e outra no final, em nosso estudo optamos por utilizar o mesmo protocolo de tratamento, com utilização de duas doses de rBmTI-a de 35,54 pmol em 50 µL de solução salina.

No presente estudo, os animais sensibilizados e tratados com o inibidor de serinoprotease rBmTI-A apresentaram redução de aproximadamente 30% da Ers e 37% da Rrs quando comparados ao grupo sensibilizado e não tratado.

Outros inibidores de serinoprotease também apresentaram atenuação dessas respostas pulmonares. O inibidor vegetal *CrataBL* reduziu os valores de Ers e Rrs em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica (Dos Santos et al., 2014). Segundo Lim et al. (2014), três inibidores de serinoproteases FOY, FUT e UTI avaliados em seu estudo reduziram os valores de Ers e Rrs em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica. Saw e Arora (2015) também observaram redução da resistência pulmonar, em murinos com inflamação alérgica, nas vias aéreas, tratados com o inibidor de serinoprotease AEBSF.

O remodelamento está diretamente relacionado com a diminuição da função pulmonar em indivíduos e em modelos animais asmáticos e pode ser fator determinante para a hiper-responsividade (Angeli et al., 2008; Kermode et al., 2011; Toledo et al., 2013).

Na asma, o processo de remodelamento implica na deposição de fibras colágenas e elásticas (Flood-Page et al., 2003) e a MMP-9 é uma das principais metaloproteases envolvidas nesse processo. Essa metaloprotease é conhecida por ser capaz de degradar vários tipos de colágeno; gelatina;

elastina; proteínas; fibronectina e outros componentes da matriz extracelular (Atkinson e Senior, 2003; Royce et al., 2012).

Na avaliação das fibras das vias aéreas, assim como em nosso estudo, fibras colágenas e elásticas encontraram-se aumentadas, em modelos experimentais de cobaias e camundongos sensibilizados com ovoalbumina (Angeli et al., 2008; Antunes et al., 2009; Pigati et al., 2015).

Da mesma forma foi observado aumento do conteúdo de fibras elásticas na perda da estruturação das paredes alveolares em pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar de pacientes que morreram de asma fatal, mostrando a importância da matriz extracelular na patogênese de anormalidades funcionais observadas em pacientes com asma (Mauad et al., 2004).

Neste modelo, o inibidor rBmTI-A foi efetivo na redução do remodelamento, através da diminuição da porcentagem de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas dos animais sensibilizados e tratados.

Em um modelo murino de enfisema pulmonar induzido por elastase, o inibidor rBmTI-A também reduziu a porcentagem de fibras colágenas e elásticas no parênquima pulmonar (Lourenco et al., 2017) e em um estudo anterior, em diferente modelo experimental, atenuou apenas a porcentagem de fibras colágenas (Lourenco et al., 2014). O inibidor de serinoproteases *CrataBL* igualmente reduziu a fração do volume de fibras colágenas e elásticas em um modelo de asma em murinos (Dos Santos et al., 2014).

Outro inibidor de serinoprotease, EcTI, além de atenuar a deposição de fibras colágenas e elásticas em modelo de enfisema pulmonar (Theodoro-Junior et al., 2017), também atuou no bloqueio da ativação de prometaloprotease-9 (proMMP-9) (Nakahata et al., 2011).

A contribuição da MMP-9 na expressão de fibras colágenas e elásticas e consequentemente para o remodelamento, foi demonstrada em pesquisas com camundongos MMP-9 - *knockout*, os quais apresentaram redução das fibras colágenas e do infiltrado eosinofílico em comparação a camundongos *Wild type* que foram sensibilizados (Lim et al., 2006). Estudos mostram que a expressão de MMP-9 está diretamente relacionada à gravidade da asma (Belleguic et al., 2002).

A ativação de MMPs envolve outras MMPs. As serinoproteases também apresentam importante papel nesse processo (Noel et al., 2004), o que pode explicar a redução da liberação da MMP-9 no grupo sensibilizado que recebeu o inibidor de serinoprotease rBmTI-A.

O receptor ativado por proteases (PAR-2) libera MMP-9 através das células epiteliais das vias aéreas, e é ativado principalmente por serinoproteases, como tripsina e triptase (Vliagoftis et al., 2000). Considerando que houve diminuição da atividade proteolítica de tripsina-*like* no homogenato pulmonar dos animais sensibilizados que receberam o rBmTI-A, possivelmente também ocorreu redução da ativação de PAR-2 pela tripsina e, consequentemente, diminuição da liberação de MMP-9, atuando também na atenuação da deposição de fibras colágenas e elásticas observada neste mesmo grupo.

Umas das vias de regulação das MMPs, é através do equilíbrio entre a atividade proteolítica/anti-proteolítica, uma vez que a desregulação entre MMPs e seus inibidores teciduais endógenos, TIMPs, tem participação importante em processos de remodelamento tecidual (Gueders et al., 2006) .

Alguns estudos mostraram o aumento do inibidor de metaloprotease específico para MMP-9, o TIMP-1, na asma (Mautino et al., 1999; Righetti et al., 2014), assim como observado em nosso modelo experimental. Além disso, o tratamento com o inibidor rBmTI-A atenuou o aumento de TIMP-1. Essa atenuação provavelmente ocorreu de modo a acompanhar a redução da expressão de MMP-9 no grupo sensibilizado e tratado com rBmTI-A, mantendo o equilíbrio da atividade proteolítica neste grupo. Essa diminuição também foi observada em outro estudo que utilizou o mesmo modelo de asma experimental, tratada com inibidor de serinoprotease *CrataBL* (Dos Santos et al., 2014).

Nossos dados também mostram aumento do infiltrado eosinofílico nas vias aéreas dos animais sensibilizados com ovoalbumina. Todavia, o tratamento com rBmTI-A atenuou significativamente essa resposta nos animais sensibilizados. O inibidor de serinoproteases *CrataBL* também reduziu o infiltrado eosinofílico nas vias aéreas de camundongos sensibilizados com ovoalbumina (Dos Santos et al., 2014), assim como os inibidores FOY, FUT e UTI em outro modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica. (Lin et al., 2014).

A inflamação eosinofílica encontra-se aumentada em vários modelos de asma (Leick-maldonado et al., 2004; Prado et al., 2006; Angeli et al., 2008; Toledo et al., 2013).

Em humanos, há evidências de que a eosinofilia reflete a atividade asmática e é útil para a detecção precoce de exacerbações (Schwartz et al., 2012). Foi encontrado infiltrado eosinofílico e tecido de remodelamento em biópsia brônquica de crianças com sintomas respiratórios, antes mesmo de

serem diagnosticadas com asma (Pohunek et al., 2005). O que mostra o quão precocemente se iniciam essas alterações e sua importância para a clínica da doença. Sendo o infiltrado eosinofílico possivelmente o principal responsável pelo dano tecidual e remodelamento.

A avaliação das células do fluido do lavado broncoalveolar é considerada um bom parâmetro para monitorar a inflamação pulmonar (Churg e Wright, 2005). Essa forma de avaliação indireta da inflamação na asma permite a exploração de diversos locais do pulmão como pequenas e grandes vias aéreas e até mesmo os alvéolos (Bousquet et al., 1996).

Em nosso estudo, as células totais estavam aumentadas no FLBA do grupo sensibilizado em comparação aos grupos controles, assim como em outros trabalhos (Toledo et al., 2013; Dos Santos et al., 2014; Camargo et al., 2017).

Observamos que o número de polimorfonucleares e linfócitos encontrava-se aumentado no FLBA do grupo OVA, semelhante aos resultados de vários outros estudos que avaliaram o FLBA em modelos experimentais (Nath et al., 2007; Herbert et al., 2010; Silva et al., 2012; Toledo et al., 2013; Brandenberger et al., 2014).

O aumento de polimorfonucleares no FLBA provavelmente se deve ao aumento dos eosinófilos, visto que na análise do tecido com coloração específica (LUNA), observamos que ao redor das vias aéreas tratavam-se de eosinófilos, na sua grande maioria.

O aumento do número de eosinófilos no escarro de indivíduos asmáticos tem sido consistentemente relatado, além de apresentar correlação com a

gravidade da doença, difícil controle e pior prognóstico (Walters et al., 1996; Walford e Doherty, 2014; George e Brightling, 2016).

No grupo sensibilizado e tratado com rBmTI-A houve redução do número de polimorfonucleares no FLBA. No entanto, o tratamento não atenuou a resposta linfocitária. Assim como no estudo de Lourenço et al. (2014), que avaliou o efeito do rBmTI-A no enfisema pulmonar, em modelo murino, e também observou redução na concentração de eosinófilos, não havendo redução na concentração de linfócitos.

A redução de eosinófilos no FLBA de murinos sensibilizados foi observada, ainda, em estudos que utilizaram como tratamento outros inibidores de serinoproteases, como o *CrataBL* (Dos Santos et al., 2014), o Mesilato Nafamostato (Ishizaki et al., 2008), o inibidor AEBSF (Saw e Arora, 2015) e os inibidores FOY, FUT e UTI (Lin et al., 2014).

Em nosso modelo experimental não observamos diferença na concentração de macrófagos entre os grupos. Alguns estudos encontraram macrófagos aumentados no FLBA de asmáticos (Walters et al., 1996). Outros não encontraram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle (Bousquet e Michel, 1991; Boulet et al., 1993; Morokata et al., 2004), tanto em modelos experimentais, quanto em humanos.

Na avaliação de citocinas do FLBA e na avaliação imunohistoquímica encontramos redução de IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17 nos animais sensibilizados e tratados com rBmTI-A.

Diversos estudos realizados com outros inibidores de serinoproteases mostraram redução dos níveis dessas citocinas, em murinos com inflamação das vias aéreas. Segundo Lin et al. (2014), os inibidores de serinoproteases

FOY, FUT e UTI reduziram a concentração de IL-5, IL-6, IL-13 e IL-17 no FLBA em um modelo experimental de inflamação alérgica crônica em murinos. Dos Santos et al. (2015) e Saw e Arora (2015), relataram a redução da concentração de IL-4, IL-5 e IL-13 no FLBA de murinos sensibilizados e tratados com os inibidores AEBSF e *CrataBL*. Ishizaki et al. (2008) constataram a redução de IL-13 no grupo sensibilizado e tratado com Mesilato Nafamostato.

A IL-5 é uma citocina essencial para o crescimento, maturação, ativação e supressão da apoptose de eosinófilos (Menzies-Gow et al., 2003; Rothenberg e Hogan, 2006). Ela também tem sido implicada na indução de hiper-responsividade (Leckie et al., 2000). Dados demonstram que a inibição da IL-5 é eficaz na redução da exacerbação, frequente na asma grave, principalmente no subgrupo de patogenia eosinofílica (Schuijs et al., 2013).

As citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-13) induzem várias alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar que estão associadas com a asma: eosinofilia das vias respiratórias; ativação alternativa de macrófagos; proliferação de células epiteliais com hiperplasia de células caliciformes; aumento da secreção de muco; hiperplasia, hipertrofia e hipercontratilidade do músculo liso; fibrose subepitelial; liberação de IgE; aumento da produção de quimiocinas que atraem as células T, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos ou dos seus precursores para os pulmões e hiper-responsividade das vias aéreas (Holgate, 2008; Hamid e Tulic, 2009; Finkelman et al., 2010).

Em alguns modelos de inflamação das vias aéreas, em murinos, a IL-17 controla a hiper-responsividade e o remodelamento das vias aéreas. Alguns desses efeitos são mediados diretamente em células do músculo brônquico (Pichavant et al., 2008; Wang et al., 2010; Bellini et al., 2012; Kudo et al.,

2012). Além disso, a IL-17A também pode recrutar neutrófilos (McKinley et al., 2008; Miossec e Kolls, 2012), eosinófilos (Dias e Banerjee, 2013; Choy et al., 2015) e induzir a resistência das células epiteliais brônquicas aos efeitos dos esteroides (Zijlstra et al., 2012; Choy et al., 2015).

A identificação de células Th2/Th17 na asma alérgica, leva à observação de que diferentes fenótipos clínicos podem coexistir no mesmo paciente (Cosmi et al., 2011; Irvin et al., 2014; Choy et al., 2015; Vroman et al., 2015). A coexistência desses dois perfis fenotípicos está ainda relacionada à maior gravidade da doença (Brandenberger et al., 2014; Irvin et al., 2014).

A IL-10, diferente das citocinas citadas anteriormente, é conhecida por seu papel anti-inflamatório, capaz de inibir: várias citocinas (Malefyt et al., 1991); inflamação das vias aéreas induzida por alérgenos, hiper-reponsividade (Tournoy et al., 2000); TNF- α , várias quimiocinas e a apresentação do antígeno (Pretolani e Goldman, 1997). Porém, paradoxalmente também está associada à hiper-responsividade e produção de IL-5 (Kita et al., 1996; Bachert et al., 1997). Em um modelo de camundongos IL-10 *knockout*, houve redução da concentração de IL-5, da inflamação eosinofílica e da produção de muco nos animais sensibilizados, porém com deficiência de IL-10 (Yang et al., 2000).

O efeito atenuante do rBmTI-A sobre os níveis de citocinas observado em nosso estudo, pode ser atribuído ao papel das serinoproteases tripsina-*like* na ativação dos receptores ativados por protease PAR-1 e PAR-2, que parecem atuar na produção e liberação desses componentes inflamatórios. A ação da tripsina pancreática básica (BPTI) é mediada por mecanismos anti-inflamatórios através da proteção do receptor de trombina de alta afinidade, o receptor ativado por protease, PAR-1 (Shigetomi et al., 2010). O PAR-1 pode

ser ativado pela tripsina, trombina e metaloprotease de matriz-1 (MMP-1), o que leva à produção de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.(Asaduzzaman et al., 2015)) observaram a redução da hiper-responsividade, da eosinofilia e da expressão de IL-2, IL-3 IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13 e IL-17 em modelos de asma que receberam inibidores de PAR-2 e bloqueadores de sinalização de PAR-2.

As citocinas possuem papel indispensável no desenvolvimento e regulação da asma, o que mostra a importância do efeito do inibidor rBmTI-A sobre o processo inflamatório.

Este estudo apresenta limitações, pois o BmTI-A foi testado em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Assim, não podemos extrapolar nossos achados diretamente para seres humanos. Além disso, não testamos a toxicidade do inibidor.

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que o inibidor de serinoproteases rBmTI-A é eficaz na atenuação das alterações da mecânica pulmonar, inflamação e no remodelamento das vias aéreas neste modelo animal de inflamação pulmonar alérgica crônica. Embora mais estudos precisem ser realizados para elucidar os mecanismos responsáveis por essas mudanças, este inibidor parece ser um possível instrumento farmacológico para o tratamento da asma.

6 CONCLUSÕES

Neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica, podemos concluir que o inibidor de serinoproteases rBmTI-A foi eficaz na redução das seguintes respostas:

- Atividade proteolítica de tripsina-*like* no homogenato pulmonar;
- Resposta máxima de elastância e resistência do sistema respiratório;
- Quantidade de eosinófilos nas vias aéreas;
- Quantidade de polimorfonucleares no fluido do lavado broncoalveolar;
- Concentração das citocinas IL-5, IL-10, IL-13, IL-17A no fluido do lavado broncoalveolar;
- Expressão de IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, MMP-9 e TIMP-1 nas vias aéreas;
- Fração de volume das fibras colágenas e elásticas das vias aéreas.

Portanto, os nossos resultados mostraram que o inibidor de serinoproteases rBmTI-A foi eficaz na redução da hiper-responsividade à metacolina, inflamação e remodelamento das vias aéreas neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Embora mais estudos precisem ser realizados, este inibidor pode contribuir como potencial ferramenta terapêutica para o tratamento de asma.

7 REFERÊNCIAS

- Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992;101(4):916-21.
- Almeida-Reis R, Theodoro-Junior OA, Oliveira BTM, Oliva LV, Toledo-Arruda AC, Bonturi CR. Plant Proteinase Inhibitor BbCI Modulates Lung Inflammatory Responses and Mechanic and Remodeling Alterations Induced by Elastase in Mice. *BioMed Res Int*. 2017;2017:8287125.
- Alves GdC, Santos DN, Feitosa CA, Barreto ML. Community violence and childhood asthma prevalence in peripheral neighborhoods in Salvador, Bahia State, Brazil. *Cadernos De Saude Publica*. 2012;28(1):86-94.
- Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008;372(9643):1107-19.
- Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Passaro CP, Nakazato HD. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1197-L205.
- Antunes MA, Abreu SC, Damaceno-Rodrigues NR, Parra ER, Capelozzi VL, Pinart M. Different strains of mice present distinct lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a model of chronic allergic asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165(2-3):202-7.
- Arantes-Costa FM, Zoriki S, Santos MHC, Kobata CHP, Vieira JE, Martins MA. Effects of ventilation, humidity and temperature on airway responsiveness to methacholine in rats. *Eur Respir J*. 2002;19(6):1008-14.
- Asaduzzaman M, Nadeem A, Arizmendi N, Davidson C, Nichols HL, Abel M. Functional inhibition of PAR2 alleviates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2015;45(12):1844-55.
- Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):12-24.
- Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1066-79.
- Azzolini SS, Sasaki SD, Torquato JS, Andreotti R, Andreotti E, Tanaka AS. Rhipicephalus sanguineus trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination. *Arch Biochem Biophys*. 2003;417(2):176-82.
- Bachert C, Wagenmann M, Hauser U, Rudack C. IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99(6):837-42.
- Bahadori K, Doyle-Waters MM, Marra C, Lynd L, Alasaly K, Swiston J. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med*. 2009;9:24.

- Barrett AJ, Rawlings ND. Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys*. 1995;318(2):247-50.
- Belleguic C, Corbel M, Germain N, Lena H, Boichot E, Delaval PH. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(2):217-23.
- Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, Barczyk M, Schmidt M, Mattoli S. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. *Mucosal Immunol*. 2012;5(2):140-9.
- Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1360-8.
- Berger P, Compton SJ, Molimard M, Walls AF, N'Guyen C, Marthan R. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(6):804-12.
- Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice. *Can Respir J*. 2010;17(4):E85-E93.
- Bode W, Huber R. Proteinase-protein inhibitor interaction. *Biomed Biochim Acta*. 1991;50(4-6):437-46.
- Bode W, Huber R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):241-52.
- Boulet LP, Turcotte H, Boutet M, Montminy L, Laviolette M. Influence of natural antigenic exposure on expiratory flows, methacholine responsiveness, and airway inflammation in mild allergic-asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;91(4):883-93.
- Bousquet J, Michel FB. Epidemiology and treatment of asthma - the european view. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;629:15-25.
- Bousquet J, Knani J, Henry C, Liard R, Richard A, Michel FB. Undertreatment in a nonselected population of adult patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(3):514-21.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma - From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1720-45.
- Boyce JA, Austen KF. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J Exp Med*. 2005;201(12):1869-73.
- Boyce JA. Mast cells: Beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(1):24-33.
- Brandenberger C, Li N, Jackson-Humbles DN, Rockwell CE, Wagner JG, Harkema JR. Enhanced allergic airway disease in old mice is associated with a Th17 response. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(10):1282-92.
- Brannan JD, Loughheed MD. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Front Physiol*. 2012;3.

Brown JK, Jones CA, Rooney LA, Caughey GH, Hall IP. Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are via nonproteolytic actions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(2):L197-L206.

Busse WW, Lemanske RF. Advances in immunology - Asthma. *N Engl J Med*. 2001;344(5):350-62.

Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(2):4S-10S.

Calhoun WJ. Nocturnal asthma. *Chest*. 2003;123(3):399S-405S.

Camargo LDN, Righetti RF, Aristoteles L, Dos Santos TM, de Souza FCR, Fukuzaki S. Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1835.

Camelier AA, Winter DH, Jardim JR, Barboza CEG, Cukier A, Miravittles M. Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2008;34(7):514-27.

Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol*. 2003;49(6):875-84.

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

Chambers LS, Black JL, Poronnik P, Johnson PR. Functional effects of protease-activated receptor-2 stimulation on human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281(6):L1369-78.

Chen C-L, Wang S-D, Zeng Z-Y, Lin K-J, Kao S-T, Tani T. Serine protease inhibitors nafamostat mesilate and gabexate mesilate attenuate allergen induced airway inflammation and eosinophilia in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(1):105-12.

Choy DF, Hart KM, Borthwick LA, Shikotra A, Nagarkar DR, Siddiqui S. T(H)2 and T(H)17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci Transl Med*. 2015;7(301).

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999;54(9):825-57.

Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(2):153-9.

Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):551-9.

Cockcroft DW. Direct Challenge Tests Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *Chest*. 2010;138(2):18S-24S.

Cohn L, Elias JA, Chupp GL. ASTHMA: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.

Corry DB, Rishi K, Kanellis J, Kiss A, Song LZ, Xu J. Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. *Nat Immunol*. 2002;3(4):347-53.

Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011;66(8):989-98.

Covar RA. Bronchoprovocation testing in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2007;27(4):633-+.

Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell and Mol Physiol*. 2010;298(6):L715-L31.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.

Dahlen B, Shute J, Howarth P. Immunohistochemical localisation of the matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-9 within the airways in asthma. *Thorax*. 1999;54(7):590-6.

DeMeo DL, Silverman EK. alpha(1)-Antitrypsin deficiency center dot 2: Genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*. 2004;59(3):259-64.

Dias PM, Banerjee G. The Role of Th17/IL-17 on Eosinophilic Inflammation. *J Autoimmu*. 2013;40:9-20.

Dos Santos ASA, Rodrigues APD, Arantes-Costa FM, Saraiva-Romanholo BM, Filho GGN, Leick EA. Effect Of Proteinase Inhibitor Of Plant Origin Cratabl In An Experimental Model Of Chronic Allergic Pulmonary Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189.

Dykewicz MS. Asthma treatment with inhaled corticosteroids versus antileukotrienes: what exhaled nitric oxide studies do and do not tell us. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87(4):257-60.

Eden E, Mitchell D, Mehlman B, Khouli H, Nejat M, Grieco MH. Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(1):68-74.

Eden E, Hammel J, Rouhani FN, Brantly ML, Barker AF, Buist AS. Asthma features in severe alpha(1)-antitrypsin deficiency - Experience of the National Heart, Lung, and Blood Institute registry. *Chest*. 2003;123(3):765-71.

Epstein MM. Targeting memory Th2 cells for the treatment of allergic asthma. *Pharmacol Ther*. 2006;109(1-2):107-36.

Eriksson S. Studies in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand Suppl*. 1965;432:1-85.

Ernst R. Indirect costs and cost-effectiveness analysis. *Value in Health*. 2006;9(4):253-61.

Farhat AA, Mohamad AS, Shareef MM, Attia GA, Eid MA, Taha RW (2014) Asthma remodeling: the pathogenic role of matrix metalloproteinase-9. *Egypt J Chest Dis Tubercul*. 63:755–759

- Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):551-69.
- Fernandez-Rodriguez S, Ford WR, Broadley KJ, Kidd EJ. Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(5):756-63.
- Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GKK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol.* 2010;184(4):1663-74.
- Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest.* 2003;112(7):1029-36.
- Franco R, Nascimento HF, Cruz AA, Santos AC, Souza-Machado C, Ponte EV. The economic impact of severe asthma to low-income families. *Allergy.* 2009;64(3):478-83.
- Fritz H, Wunderer G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneimittelforschung.* 1983;33-1(4):479-94.
- Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR gamma: Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):15072-7.
- Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(1):236-46.
- George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Chronic Dis.* 2016;7(1):34-51.
- GINA. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2017 [citado 1 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>.
- Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med.* 1993;44:85-101.
- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kda type-iv collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex-formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem.* 1992;267(7):4583-91.
- Gorman MJ, Paskewitz SM. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(3):257-62.
- Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):133-44.

- Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*. 2009;58(12):845-54.
- Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of Asthma. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:489-507.
- Hashimoto K, Peebles RS, Sheller JR, Jarzecka K, Furlong J, Mitchell DB. Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *Thorax*. 2002;57(6):524-7.
- He S, Gaca MDA, Walls AF. A role for tryptase in the activation of human mast cells: Modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286(1):289-97.
- He SH, Walls AF. Human mast cell tryptase: A stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol*. 1997;328(1):89-97.
- Hendeles L, Asmus M, Chesrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 Suppl A:S107-12.
- Herbert C, Scott MM, Scruton KH, Keogh RP, Yuan KC, Hsu K. Alveolar Macrophages Stimulate Enhanced Cytokine Production by Pulmonary CD4(+) T-Lymphocytes in an Exacerbation of Murine Chronic Asthma. *Am J Pathol*. 2010;177(4):1657-64.
- Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(6):872-97.
- Homer RJ, Elias JA. Consequences of long-term inflammation - Airway remodeling. *Clin Chest Med*. 2000;21(2):331-43.
- Hopp RJ, Bewtra AK, Nair NM, Townley RG. Specificity and sensitivity of methacholine inhalation challenge in normal and asthmatic-children. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;74(2):154-8.
- Horn SC. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. Brasília: Ministério da Agricultura; 1983.
- Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(13):6065-9.
- Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM. Increased frequency of dual-positive T(H)2/T(H)17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1175-1186.
- Ishizaki M, Tanaka H, Kajiwarra D, Toyohara T, Wakahara K, Inagaki N. Nafamostat Mesilate, a potent serine protease inhibitor, inhibits airway eosinophilic inflammation and airway epithelial remodeling in a murine model of allergic asthma. *J Pharmacol Sci*. 2008;108(3):355-63.
- James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J*. 2007;30(1):134-55.

Johnson PRA, Ammit AJ, Carlin SM, Armour CL, Caughey GH, Black JL. Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *Eur Respir J*. 1997;10(1):38-43.

Johnson PRA, Roth M, Tamm M, Hughes M, Ge Q, King G. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(3):474-7.

Kariyawasam HH, Aizen M, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):896-904.

Kaufman WR. Tick-host interaction - a synthesis of current concepts. *Parasitol Today*. 1989;5(2):47-56.

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

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

Kernmode JA, Brown NJ, Hardaker KM, Farah CS, Berend N, King GG. The effect of airway remodelling on airway hyper-responsiveness in asthma. *Resp Med*. 2011;105(12):1798-804.

Kim H, Bernstein JA. Air pollution and allergic disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;9(2):128-33.

Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2010;11(7):577-84.

Kita H, Sur S, Hunt LW, Edell ES, Weiler DA, Swanson MC. Cytokine production at the site of disease in chronic eosinophilic pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(4):1437-41.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.

Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T. Bradykinin stimulates type II alveolar cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity and inflammatory cytokines. *Am J Pathol*. 1998;153(6):1885-93.

Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X. IL-17A produced by alpha beta T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med*. 2012;18(4):547-54.

Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Current Opin Immunol*. 2004;16(6):702-8.

Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. 2015;16(1):45-56.

Lanone S, Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Ma B. Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and-12 in IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Clin Invest*. 2002;110(4):463-74.

Lazaar AL, Panettieri RA. Is airway remodeling clinically relevant in asthma? *Am J Med.* 2003;115(8):652-9.

Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* 2000;356(9248):2144-8.

Lee YC, Song CH, Lee HB, Oh JL, Rhee YK, Park HS. A murine model of toluene diisocyanate-induced asthma can be treated with matrix metalloproteinase inhibitor. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(6):1021-6.

Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT. 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.

Lemanske RF, Busse WW. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S95-S102.

Liang G, Bowen JP. Development of Trypsin-Like Serine Protease Inhibitors as Therapeutic Agents: Opportunities, Challenges, and their Unique Structure-Based Rationales. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(13):1506-29.

Lim DH, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Broide DH. Reduced peribronchial fibrosis in allergen-challenged MMP-9-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(2):L265-L71.

Lin C-C, Lin L-J, Wang S-D, Chiang C-J, Chao Y-P, Lin J. The Effect of Serine Protease Inhibitors on Airway Inflammation in a Chronic Allergen-Induced Asthma Mouse Model. *Mediators Inflamm.* 2014.

Lourenco JD, Neves LP, Olivo CR, Duran A, Almeida FM, Arantes PMM. A Treatment with a Protease Inhibitor Recombinant from the Cattle Tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) Ameliorates Emphysema in Mice. *PLoS One.* 2014;9(6):9.

Lourenco JD, Ito JT, Cervilha DAB, Sales DS, Riani A, Suehiro CL. The tick-derived rBmTI-A protease inhibitor attenuates the histological and functional changes induced by cigarette smoke exposure. *Histol Histopathol.* 2017:11927.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 (vol 380, pg 2095, 2012). *Lancet.* 2013;381(9867):628-.

Luster AD, Tager AM. T-CELL trafficking in asthma: Lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(9):711-24.

Malefyt RD, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Tevelde A, Figdor C. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class-II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174(4):915-24.

- Martin-Orozco E, Norte-Munoz M, Martinez-Garcia J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Front Pediatr*. 2017;5:117.
- Martins-Oliveira BT, Almeida-Reis R, Theodoro-Junior OA, Oliva LV, Neto Dos Santos Nunes N, Olivo CR. The Plant-Derived Bauhinia bauhinioides Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) Attenuates Elastase-Induced Emphysema in Mice. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5346574.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Program G. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*. 2004;59(5):469-78.
- Mattos W, Lim S, Russell R, Jatakanon A, Chung F, Barnes PJ. Matrix metalloproteinase-9 expression in asthma - Effect of asthma severity, allergen challenge, and inhaled corticosteroids. *Chest*. 2002;122(5):1543-52.
- Mauad T, Silva LFF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FDC, Martins MA. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):857-62.
- Mautino G, Capony F, Bousquet J, Vignola AM. Balance in asthma between matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3 Pt 1):530-3.
- McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med*. 2017;4:93.
- McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, DuPont RB, Kapadia S, Logar A. T(H)17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*. 2008;181(6):4089-97.
- Menzies-Gow A, Flood-Page P, Sehmi R, Burman J, Hamid Q, Robinson DS. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111(4):714-9.
- Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and T(H)17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):763-76.
- Molinari JF, Scuri M, Moore WR, Clark J, Tanaka R, Abraham WM. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(3):649-53.
- Monteseirin J, Galindo PA, Perez J, Bobadilla P, Conde J. Plasma kallikrein amidolytic activity in bronchial asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1992;20(5):211-4.
- Morokata T, Suzuki K, Ida K, Tsuchiyama H, Ishikawa J, Yamada T. Effect of a novel interleukin-5 receptor antagonist, YM-90709 (2,3-dimethoxy-6,6-dimethyl-5,6-dihydrobenzo 7,8 indolizino 2,3-b quinoxaline), on antigen-induced airway inflammation in BN rats. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(7):873-83.
- Mousavi SA, Mohammadzadeh V, Loni E. Determination of alpha-1 antitrypsin level in patients with severe asthma. *Tanaffos*. 2013;12(4):19-22.

- Nakahata AM, Mayer B, Ries C, Andrade de Paula CA, Karow M, Neth P. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. *Biol Chem*. 2011;392(4):327-36.
- Nath P, Leung SY, Williams AS, Noble A, Xie S, McKenzie ANJ. Complete inhibition of allergic airway inflammation and remodelling in quadruple IL-4/5/9/13(-/-) mice. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(10):1427-35.
- Newcomb DC, Peebles RS, Jr. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(6):755-60.
- Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*. 2008;1(4-5):213-20.
- Nishioka T, Uchida K, Meno K, Ishii T, Aoki T, Imada Y. Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(1):46-54.
- Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):577-84.
- O'Byrne PM, Inman MD. Airway hyperresponsiveness. *Chest*. 2003;123(3 Suppl):411S-6S.
- O'Byrne PM, Gauvreau GM, Brannan JD. Provoked models of asthma: what have we learnt? *Clin Exp Allergy*. 2009;39(2):181-92.
- O'Byrne PM. Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance Introduction. *Chest*. 2010;138(2):1S-3S.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu YM, Hunte B. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715-25.
- Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency - A cooperative, retrospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(6):742-8.
- Papaioannou AI, Kostikas K, Zervas E, Kolilekas L, Papiris S, Gaga M. Control of asthma in real life: still a valuable goal? *Eur Respir Rev*. 2015;24(136):361-9.
- Pauwels RA, Brusselle GJ, Kips JC. Cytokine manipulation in animal models of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(4):S78-S81.
- Payne DNR, Rogers AV, Adelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(1):78-82.
- Perry TT, Corren J, Philip G, Kim EH, Conover-Walker MK, Malice MP. Protective effect of montelukast on lower and upper respiratory tract responses to short-term cat allergen exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004;93(5):431-8.
- Petak F, Hantos Z, Adamiczak A, Asztalos T, Sly PD. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: Effects of intravenous vs. aerosol delivery. *J Appl Physiol*. 1997;82(5):1479-87.

Peters-Golden M. The alveolar macrophage the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31(1):3-7.

Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med.* 2008;205(2):385-93.

Pigati PA, Righetti RF, Possa SS, Romanholo BS, Rodrigues AP, Dos Santos AS. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. *BMC Pulm Med.* 2015;15:85.

Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16(1):43-51.

Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(5):434-9.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35(4):457-65.

Pretolani M, Goldman M. IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? *Immunol Today.* 1997;18(6):277-80.

Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J.* 2004;378:705-16.

Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet L-P, Boushey HA, Busse WW. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations Standardising Endpoints for Clinical Asthma Trials and Clinical Practice. *American Journal Respir Crit Care Med.* 2009;180(1):59-99.

Redington AE. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):263-76.

Reed CE. Asthma in the elderly: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(4):681-7; quiz 8-9.

Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods Plant Biochemistry.* New York 1991.

Righetti RF, Pigati PA, Possa SS, Habrum FC, Xisto DG, Antunes MA. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014;192:134-46.

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

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:147-74.

- Royce SG, Cheng V, Samuel CS, Tang MLK. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(2):167-75.
- Saetta M, Distefano A, Rosina C, Thiene G, Fabbri LM. Quantitative structural-analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(1):138-43.
- Sasaki SD, Azzolini SSA, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. Boophilus microplus tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie*. 2004;86(9-10):643-9.
- Sasaki SD, Tanaka AS. rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick Boophilus microplus, its cloning, expression and biochemical characterization. *Vet Parasitol*. 2008;155(1-2):133-41.
- Saw S, Arora N. Protease Inhibitor Reduces Airway Response and Underlying Inflammation in Cockroach Allergen-Induced Murine Model. *Inflamm*. 2015;38(2):672-82.
- Schandene L, Alonsovega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T. B7/CD28-Dependent IL-5 production by human resting t-cells is inhibited by IL-10. *J Immunol*. 1994;152(9):4368-74.
- Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, Lambrecht BN. Cytokine targets in airway inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(3):351-61.
- Schutz VCR, Drewiacki T, Nakashima AS, Arantes-Costa FM, Prado CM, Kasahara DI. Oral tolerance attenuates airway inflammation and remodeling in a model of chronic pulmonary allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165(1):13-21.
- Scichilone N, Ventura MT, Bonini M, Braidò F, Bucca C, Caminati M. Choosing wisely: practical considerations on treatment efficacy and safety of asthma in the elderly. *Clin Mol Allergy*. 2015;13(1):7.
- Sekizawa K, Caughey GH, Lazarus SC, Gold WM, Nadel JA. Mast-cell tryptase causes airway smooth-muscle hyperresponsiveness in dogs. *J Clin Invest*. 1989;83(1):175-9.
- Senior RM, Anthonisen NR. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4 Pt 2):S139-47.
- Sheppard MN, Harrison NK. New perspectives on basic mechanisms in lung-disease .1. lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax*. 1992;47(12):1064-74.
- Shigetomi H, Onogi A, Kajiwara H, Yoshida S, Furukawa N, Haruta S. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflamm Res*. 2010;59(9):679-87.
- Silva ACD, Vieira RP, Nisiyama M, Santos ABG, Perini A, Mauad T. Exercise Inhibits Allergic Lung Inflammation. *International Journal of Sports Medicine*. 2012;33(5):402-9.
- Soares TS, Oliveira F, Torquato RJ, Sasaki SD, Araujo MS, Paschoalin T. BmTI-A, a Kunitz type inhibitor from Rhipicephalus microplus able to interfere in vessel formation. *Vet Parasitol*. 2016;219:44-52.

- Sont JK, Willems LNA, Bel EH, van Krieken J, Vandenbroucke JP, Sterk PJ. Clinical control and histopathologic outcome of asthma when using airway hyperresponsiveness as an additional guide to long-term treatment. *American J Respir Crit Care Med*. 1999;159(4):1043-51.
- Southam DS, Ellis R, Wattie J, Inman MD. Components of airway hyperresponsiveness and their associations with inflammation and remodeling in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(4):848-54.
- Stockley RA. Alpha-1-antitrypsin deficiency: what next? *Thorax*. 2000;55(7):614-8.
- Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365(9478):2225-36.
- Sun G, Stacey MA, Schmidt M, Mori L, Mattoli S. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol*. 2001;167(2):1014-21.
- Schwartz, N., Grossman, A., Levy, Y., and Schwarz, Y. (2012). Correlation between eosinophil count and methacholine challenge test in asymptomatic subjects. *J. Asthma* 49, 336–341.
- Takayama M, Ishibashi M, Ishii H, Kuraki T, Nishida T, Yoshida M. Effects of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1800-7.
- Tanaka AS, Andreotti R, Gomes A, Torquato RJS, Sampaio MU, Sampaio CAM. A double headed serine proteinase inhibitor - human plasma kallikrein and elastase inhibitor - from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology*. 1999;45(1-3):171-7.
- Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ohmichi M, Abe S. Sputum matrix metalloproteinase-9: Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(5):900-5.
- Theodoro-Junior OA, Righetti RF, Almeida-Reis R, Martins-Oliveira BT, Oliva LV, Prado CM. A Plant Proteinase Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Attenuates Pulmonary Mechanics, Inflammation and Remodeling Induced by Elastase in Mice. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).
- Tiberio I, Turco GMG, LeickMaldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth M. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1739-47.
- Toledo AC, Sakoda CPP, Perini A, Pinheiro NM, Magalhaes RM, Grecco S. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Br J Pharmacol*. 2013;168(7):1736-49.
- Tomashefski JF, Crystal RG, Wiedemann HP, Mascha E, Stoller JK, Alpha 1-Antitrypsin Deficiency R. The bronchopulmonary pathology of Alpha-1 Antitrypsin (AAT) deficiency: Findings of the death review Committee of the National Registry for individuals with severe deficiency of Alpha-1 antitrypsin. *Hum Pathol*. 2004;35(12):1452-61.

Torres R, Picado C, de Mora E. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(3):141-52.

Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(6):775-83.

Tse K, Horner AA. Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008;8(6):475-83.

Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma - Potential therapeutic target. *Chest*. 2003;123(3):348S-55S.

van den Wijngaart LS, Roukema J, Merkus PJFM. Respiratory disease and respiratory physiology: Putting lung function into perspective: paediatr Asthma. *Respirology*. 2015;20(3):379-88.

van Scott MR, Justice JP, Bradfield JF, Enright E, Sigounas A, Sur S. IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol. Lung cellular and molecular physiology*. 2000;278(4):L667-74.

Vanaudenaerde BM, Verleden SE, Vos R, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Geenens R. Innate and Adaptive Interleukin-17-producing Lymphocytes in Chronic Inflammatory Lung Disorders. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(8):977-86.

Vergiliana JF, Asokanathan N, Stewart GA. Activation of the plasma kallikrein-kinin system on human lung epithelial cells. *Biol Chem*. 2010;391(9):1067-77.

Vieira RP, de Andrade VF, Duarte ACS, dos Santos ABG, Mauad T, Martins MA. Aerobic conditioning and allergic pulmonary inflammation in mice. II. Effects on lung vascular and parenchymal inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(4):L670-L9.

Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M. Increased levels of elastase and alpha(1)-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):505-11.

Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(6):1041-53.

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

Vliagoftis A, Schwingshackl A, Milne CD, Duszyk M, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(3):537-45.

von Ehrenstein OS, Maier EM, Weiland SK, Carr D, Hirsch T, Nicolai T. a(1) Antitrypsin and the prevalence and severity of asthma. *Arch Dis Child*. 2004;89(3):230-1.

- Vroman H, van den Blink B, Kool M. Mode of dendritic cell activation: The decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology*. 2015;220(2):254-61.
- Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration during endotoxemia. *J Leukoc Biol*. 1999;66(1):10-24.
- Walford HH, Doherty TA. Diagnosis and management of eosinophilic asthma: a US perspective. *J Asthma Allergy*. 2014;7:53-65.
- Walters EH, Ward C, Li X. Bronchoalveolar lavage in asthma research. *Respirology*. 1996;1(4):233-45.
- Wang Y-H, Voo KS, Liu B, Chen C-Y, Uygungil B, Spoede W. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med*. 2010;207(11):2479-91.
- Weibel ER. Morphometry of the human lung. New York: Academic Press; 1963.
- Weibel ER. The challenge of measuring lung structure. On the "Standards for the Quantitative Assessment of Lung Structure". *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2010;48(9):637-43.
- Wills-Karp M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. *Immunopharmacology*. 2000;48(3):263-8.
- Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*. 2004;202:175-90.
- Yang X, Wang SH, Fan YJ, Han XB. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. *Eur J Immunol*. 2000;30(2):382-91.
- Yasui K, Kanda H, Iwanami T, Komiyama A. Increased serum concentration of urinary trypsin inhibitor with asthma exacerbation. *Eur Respir J*. 2003;22(5):739-42.
- Zhang M, Peng B, Niehus J, Baumgarten CR, Brunnee T, Thalhofer S. Kinin generation in acute pneumonia and chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 1997;10(8):1747-53.
- Zijlstra GJ, ten Hacken NHT, Hoffmann RF, van Oosterhout AJM, Heijink IH. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2012;39(2):439-45.
- ZuanyAmorim C, Creminon C, Nevers MC, Nahori MA, Vargaftig BB, Pretolani M. Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4(+) T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity. *J Immunol*. 1996;157(1):377-84.
- Zuanyamorim C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaftig BB. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2644-51.