Leandro do Nascimento Camargo

**O efeito do anti-IL-17 na inflamação,
remodelamento e estresse oxidativo em
modelo experimental de inflamação pulmonar
alérgica crônica exacerbado por LPS**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos

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

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

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Camargo, Leandro do Nascimento

O efeito do anti-IL-17 na inflamação,
remodelamento e estresse oxidativo em modelo
experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica
exacerbado por LPS / Leandro do Nascimento Camargo.

-- São Paulo, 2018.

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

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

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo
Tibério.

Descritores: 1. Interleucina-17/imunologia
2. Tecido parenquimatoso 3. Doenças pulmonares
intersticiais 4. Asma 5. Pulmão 6. Inflamação
7. Lipopolissacarídeos

USP/FM/DBD-164/18

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adilson Camargo e Valdete Camargo e minha vó Ana Maria por todo apoio, carinho e amor em todas as etapas da minha vida. Meu eterno agradecimento por tudo.

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota." (Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por tudo que tem me proporcionado e por me sustentar durante esse processo.

À minha orientadora Profa. Dra. Iolanda F. L. C. Tibério, pelo apoio e dedicação. Sempre muito atenciosa e pronta para ajudar a qualquer hora. Obrigado por acreditar em mim e me fazer crescer durante essa trajetória, suas correções e orientações me fizeram enxergar novos horizontes e ser uma pessoa e um profissional melhor.

À minha família, meus pais, Adilson Camargo e Valdete Camargo e meus irmãos, Lilian Camargo e Lenon Camargo, mesmo distante sempre me fizeram sentir próximo com as ligações diárias e mensagens. Obrigado pelo auxílio e incentivos que recebi durante essa etapa da minha vida. Vocês são importantes para mim. Obrigado por tudo, amo vocês.

Ao Dr. Renato Righetti e Dra. Edna Leick pessoas essências que estiveram presentes durante todos os processos desse trabalho. Aprendi muito com vocês, obrigado pelos ensinamentos e conselhos.

À Tabata Maruyama, que se tornou uma grande amiga, obrigado pelas palavras positivas e incentivos. Você foi fundamental nos momentos estressantes, sempre com conselhos assertivos que me fizeram seguir em frente.

À Dra. Luciana Aristóteles e Dra. Flávia Ribas pessoas incríveis que

conheci durante o mestrado, obrigado pela ajuda nas leituras de lâminas e por me ensinar todos os processos do laboratório. Confesso, não foi fácil, porém com vocês esses processos foram mais leves e divertidos.

À Dra. Fernanda Lopes pela ajuda nas leituras do LM, obrigado pelos ensinamentos. À Dra. Beatriz Saraiva e suas alunas pelas leituras do lavado broncoalveolar.

À Dra. Maria Alonso-Vale e Dra. Maysa Mariana pela ajuda nos processos e análise do RT-PCR.

À equipe de pesquisadores e colaboradores do LIM-20: Sílvia Fukuzaki, Carla Máximo Prado, Clarice Olivio, Fernandes Arantes e Rosana Reis pelas colaborações diretas e indiretas neste estudo.

À Dra. Samantha Possa por ter me apresentado ao grupo de pesquisa e Dra. Iolanda e ter tido essa oportunidade de aprendizado e crescimento.

Aos meus amigos do Hospital das Clínicas da UTI de anestesiologia, Catherine Oliveira, Mariana Brito, Jessica Petito, Natália Pontes, Juliana Leite, Larrisa Ruivo que sempre prontas auxiliaram com trocas de plantões e flexibilidade na escala durante esse processo.

Ao Gabriel Vitoriano e Márcia Limeira amigos sempre presentes com conselhos e palavras de motivação. Obrigado pelo estímulo e amizade

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

INTRODUÇÃO

1	Asma brônquica	1
1.1	Definição	1
1.2	Classificação	3
1.3	Epidemiologia	5
1.4	Fisiopatologia da asma	7
1.5	Asma e o perfil Th17	11
1.6	Quimiocinas e seu papel na asma	15
1.7	Remodelamento	17
1.8	Estresse oxidativo	22
1.9	Vias sinalizadoras NF-kB e Rho-quinase na asma	26
1.1.1	O parênquima pulmonar e a asma	30
1.1.2	O uso do LPS (lipopolissacarídeo) em modelo animal	32
1.1.3	Inibidor da IL-17	36
2	Justificativa	37

OBJETIVOS

MATERIAL E MÉTODOS

4.1	Animais	42
4.2	Grupos Experimentais	42
4.3	Protocolo de sensibilização	44
4.4	Administração de LPS	45
4.5	Tratamento com anticorpo neutralizador anti-IL-17	46
4.6	Análise do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)	46
4.7	Coloração imunohistoquímica	47
4.8	Avaliação do diâmetro alveolar médio (LM)	49
4.9	Estudos Morfométricos	50
4.1.0	Avaliação do edema	51
4.1.1	Avaliação da expressão gênica de IL-6 por RT-PCR	50
4.1.2	Análise estatística	53

RESULTADOS

5.1	Diâmetro alveolar médio (LM)	55
5.2	Edema intersticial	56
5.3	Efeitos do anti-IL-17 no fluido do lavado broncoalveolar	57
5.4	Efeito do anti-IL-17 na expressão gênica e na expressão	60

5.5	Efeitos do tratamento com anti-IL-17 na inflamação	62
5.6	Efeitos do anti-IL-17 no número de células T Reguladoras	71
5.7	Efeitos do anti-IL-17 remodelamento da matriz extracelular	72
5.8	Efeitos de anti-IL-17 no estresse oxidativo	81
5.9	Efeitos do tratamento com anti-IL-17 nas vias sinalizadoras	83
5.1.0.1	Efeitos do tratamento com anti-IL-17 através da análise. qualitativa	85

DISCUSSÃO

96

CONCLUSÕES

105

REFERÊNCIAS

108

ANEXO

136

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA		Análise de variância
Ca ²⁺		Cálcio
CD		Célula dendrítica
CLM		Cadeia leve da miosina
cNOS		Óxido nítrico sintase constitutiva
DNA		Ácido desoxirribonucleico
DAB		Diaminobenzidina
eNOS		Óxido nítrico sintase derivada do endotélio
FGF		Fator de crescimento de fibroblastos
GAPs		Proteínas ativadoras de GTPases
G-CSF		Fator de estimulação de colônias de granulócitos
GM-CSF		Fator de estimulação de colônias granulócitos/macrófagos
H ₂ O ₂		Peróxido de hidrogênio
HRAV		Hiperresponsividade das vias aéreas
IFN		Interferon
Ig		Imunoglobulina
IL		Interleucina
LPS		Lipopolissacarídeo
LPB		Proteína ligante de LPS
LPA		Lesão pulmonar aguda

iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
MD-2	Proteína mielóide diferenciadora 2
MEC	Matriz extracelular
MF	Miosinofosfatase
MMP	Metaloproteinase
MQ	Miosinoquinase
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NF	Fator nuclear
NIH	National Institutes of Health
NOS	Óxido nítrico sintase derivada dos neurônios
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
ONOO-	Peroxinitrito
PBS	Solução tampão salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	T helper
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T regulatória

TRL4 Receptores Toll-like 4

RESUMO

Camargo LN. O efeito do anti-IL-17 na inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbado por LPS [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A inflamação desempenha um papel central no desenvolvimento da asma, que é considerada uma doença alérgica com um perfil inflamatório clássico Th2. No entanto, as citocinas de perfil IL-17 tem sido estudadas para melhor compreender sua participação na fisiopatologia desta doença. Pacientes asmáticos graves apresentam exacerbações frequentes, sendo a causa infecciosa um dos principais desencadeantes e que podem perpetuar as respostas inflamatórias. A resposta Th17 pode estar claramente associada a esses eventos. **OBJETIVO:** Este estudo avaliou os efeitos da terapia com anticorpo monoclonal anti-IL-17 nas alterações presentes nos septos alveolares em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbado por LPS. **MÉTODOS:** Foram utilizados 60 camundongos macho da espécie BALB/c, sendo sensibilizados com ovoalbumina intraperitoneal e repetidamente expostos à inalação com ovoalbumina, seguidos por tratamento com ou sem anti-IL-17. Vinte e quatro horas antes do final do protocolo experimental de 29 dias, dois grupos receberam LPS intratraqueal (0,1 mg/ml, sendo os grupos OVA-LPS e OVA-LPS anti-IL-17). Posteriormente, avaliamos o fluido do lavado broncoalveolar (FLBA), por morfometria quantificamos o recrutamento das células apresentadoras de antígenos (FOXP3

e células dendríticas), de eosinófilos, a expressão celular de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL13 e IL-17), anti-inflamatórias (IL-10), quimiocina (TARC), além da quantificação de IL-6 por RT-PCR. Avaliamos também elementos da matriz extracelular (fibras colágenas tipo I e III, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TGF-beta, actina, decorina, lumican, biglicano, fibronectina e integrina), edema dos septos alveolares, resposta das vias de estresse oxidativo através dos marcadores iNOS e 8-iso-PGF2 α e as vias sinalizadoras NF-kB e Rho quinase, além da avaliação do diâmetro alveolar médio. **RESULTADOS:** Os animais do grupo OVA-LPS apresentaram uma potencialização de todas as respostas ($p < 0,05$) comparativamente ao grupo OVA, exceto para: expressão de IL-17, TNF-alfa, NF-kB, TIMP-1 e na fração de volume de fibras colágenas tipo I, decorina, lumican e actina. No grupo OVA-anti-IL17 houve atenuação de todos os parâmetros quando comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Nos animais do modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS e tratado com anti-IL-17 (grupo OVA-LPS anti-IL-17) houve diminuição comparativamente ao grupo OVA-LPS dos seguintes parâmetros: número de células totais do lavado broncoalveolar, de células positivas para FOXP3 e células dendríticas, número de CD4+ e CD8+, de células positivas para IL-10 anti-inflamatória e citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-17); quimiocinas (TARC), expressão gênica de IL-6, edema nos septos alveolares; elementos da matriz extracelular (fração de volume de fibras colágenas tipo I e III, actina, decorina, biglicano, lumican, fibronectina, integrina e expressão de células positivas para TGF-beta, MMP-9, MMP-12 e TIMP-1), da resposta das vias de estresse oxidativo: (células positivas para iNOS e fração de volume de isoprostano PGF-2alfa; da expressão celular de NF-kB, e das proteínas Rho

quinase 1 e 2 ($p < 0,05$). Não houve diferenças no diâmetro alveolar médio entre todos os grupos experimentais. **CONCLUSÃO:** Esses dados sugerem que a inibição da IL-17 pode ser uma via terapêutica promissora para o tratamento da inflamação alérgica crônica, mesmo durante uma exacerbação e pode contribuir para o controle da inflamação Th1/ Th2/Th17, da expressão de quimiocinas, do remodelamento da matriz extracelular e do estresse oxidativo. As vias sinalizadoras de NF- κ B e Rho-quinase estão envolvidas no controle dessas respostas neste modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS.

Descritores: interleucina-17/imunologia; tecido parenquimatoso; doenças pulmonares intersticiais; asma; pulmão; inflamação; lipopolissacarídeos

SUMMARY

Camargo LN. *The effect of anti-IL-17 on inflammation, remodeling and oxidative stress in an experimental model of chronic allergic pulmonary inflammation exacerbated by LPS* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018

INTRODUCTION: Inflammation plays a central role in the development of asthma, which is considered an allergic disease with a classic Th2 inflammatory profile. However, IL-17 profile cytokines have been studied to better understand their involvement in the pathophysiology of this disease. Severe asthmatic patients have frequent exacerbations, the infectious cause being one of the main triggers and that can perpetuate the inflammatory responses. The Th17 response may be clearly associated with these events. **OBJECTIVE:** This study evaluates the effects of anti-IL-17 monoclonal antibody therapy on alveolar septa in an experimental model of chronic allergic lung inflammation of asthma exacerbated by LPS. **METHODS:** Sixty male BALB / c mice were used, being sensitized with intraperitoneal ovalbumin and repeatedly exposed to inhalation with ovalbumin, followed by treatment with or without anti-IL-17. Twenty-four hours before the end of the 29-day experimental protocol, two groups received intratracheal LPS (0.1 mg / ml, OVA-LPS and anti-IL-17 OVA-LPS groups). Afterwards, we evaluated bronchoalveolar lavage fluid (BALF), by morphometry we quantified the recruitment of antigen-presenting cells (FOXP3 and dendritic cells), eosinophils, the cellular expression of proinflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-2, IL IL-5, IL-6, IL-13 and IL-17), anti-inflammatory cytokines (IL-10), chemokine (TARC), and quantification of IL6 by RT-PCR. We also evaluated elements of the extracellular

matrix (collagen fibers type I and III, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TGF-beta, actin, decorin, lumican, biglycan and fibronectin), alveolar septum edema, oxidative stress through the marker iNOS and 8-iso-PGF2 α and the signaling pathways NF-kB and Rho kinase. In addition, we evaluated of the mean alveolar diameter.

RESULTS: The animals of the OVA-LPS group presented a potentiation of the all responses compared to OVA ($p < 0.05$), except for: expression of IL-17, TNF-alpha, NF-kB, TIMP-1 and in the volume fraction of type I collagen fibers, decorin, lumican and actin. Treatment with anti-IL-17 (OVA-anti-IL17 group) attenuated all parameters compared to OVA group ($p < 0.05$). The animals of the chronic allergic inflammation model exacerbated by LPS and treated with anti-IL-17 (OVA-LPS anti-IL-17 group) had a decreased of the following parameters compared to OVA-LPS: total bronchoalveolar lavage cells number, FOXP3 and dendritic positive cells, CD4 + and CD8 + numbers, of cells positive for IL-10 anti-inflammatory, and pro-inflammatory cytokines (TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 and IL-17); chemokine (TARC), genic expression IL6; edema in the alveolar septum; extracellular matrix elements (volume fraction of collagen fibers type I and III, actin, decorin, biglycan, lumican, fibronectin, and expression of TGF-beta, MMP-9, MMP-12 and TIMP-1 positive cells) of the oxidative stress pathways response (iNOS positive cells and isoprostane volume fraction 8-isoPGF-2 α) NF-kB and Rho kinase 1 and 2 positive cells ($p < 0.05$). There were no differences in mean alveolar diameter among all experimental groups. **CONCLUSION:** These data suggest that inhibition of IL-17 may be a promising therapeutic pathway for the treatment of chronic allergic inflammation, even during an exacerbation, and may contribute to the control of Th1 / Th2 / Th17 inflammation, chemokine expression, extracellular matrix remodeling and oxidative stress. Signaling

pathways of NF- κ B and Rho-kinase are involved in the control of these responses in this model of chronic allergic inflammation exacerbated by LPS.

Descriptors: interleukin-17/immunology; parenchymal tissue; lung diseases, interstitial; asthma; inflammation; lung; lipopolysaccharides.

INTRODUÇÃO

1 Asma Brônquica

1.1 Definição

A asma é uma doença crônica comum e potencialmente grave que pode ser controlada, mas não curada. Apresenta os sintomas como sibilância, falta de ar, aperto no peito e tosse que variam ao longo do tempo em sua ocorrência, frequência e intensidade. Os sintomas estão associados ao fluxo de ar expiratório variável devido a broncoconstrição, espessamento da parede da via aérea e muco. Os sintomas podem ser desencadeados ou piorados por fatores como infecções virais, alérgenos, fumaça do tabaco, exercício e estresse (GINA, 2018).

A condição heterogênea na asma inclui episódios agudos que podem ser revertidos espontaneamente ou com tratamento, sintomas persistentes e redução da função pulmonar estão ligados as alterações estruturais que ocorre devido ao processo inflamatório crônico (Lemanske, 2009; Reddel *et al.*, 2009).

Os principais fatores que estão ligados ao processo de inflamação e sintomas de hiperreatividade das vias aéreas são: fatores genéticos e ambientais como por exemplos: poeira, alimentos, fármacos, pólen, fungos, insetos, exercício, alterações ambientais e meteorológicas, poluentes atmosféricos, infecções virais e ou bacterianas, irritantes químicos, estresse e vários outros (Hashimoto e Nakahara, 2002; Lemanske, 2009).

A asma afeta indivíduos de ambos os sexos em todas as faixas etárias levando a um alto impacto social e econômico (Lloyd e Hessel, 2010; Poon *et al.*, 2012).

A *Global Initiative for Asthma* (GINA) define o controle da asma em dois domínios em sua versão de 2018: controle dos sintomas e riscos de exacerbação. O controle dos sintomas é baseado na presença e frequência de sintomas diurnos e noturnos; limitações das atividades do cotidiano e a necessidade de uso de medicação de resgate. Em relação ao risco de exacerbação deve ser avaliado necessidade de intubação por causa da asma, sintomas de asma não controlados, ter tido mais de uma exacerbação nos últimos 12 meses, tabagismo e obesidade são alguns dos fatores a serem avaliados. (Figura 1 e 2) (GINA, 2018).

1.2 Classificação

A classificação da gravidade da asma deve ser feita após a exclusão de causas importantes de descontrole, tais como comorbidades não tratadas, uso incorreto do dispositivo inalatório e não adesão ao tratamento.

A. Controle dos sintomas		Nível de controle dos sintomas de asma		
Nas últimas 4 semanas, o paciente teve:		Bem-controlado	Parcialmente controlado	Não controlado
• Sintomas diurnos de asma mais de duas vezes por semana?	Sim ☐ Não ☐	Nenhum desses	1 a 2 desses	3 a 4 desses
• Despertar noturno devido à asma?	Sim ☐ Não ☐			
• Necessidade de medicação para alívio dos sintomas* mais de duas vezes por semana?	Sim ☐ Não ☐			
• Limitação de alguma atividade devido à asma?	Sim ☐ Não ☐			

Figura 1 - Níveis do controle de sintomas da asma (GINA, 2018)

Atualmente a asma grave está associada a uma forma de doença não controlada, com alto risco de desenvolver exacerbações grave colocando em risco a vida (Ubel *et al.*, 2014). A gravidade da asma é avaliada de forma

retrospectiva a partir da etapa de tratamento necessário para controlar sintomas e exacerbações, sendo a gravidade não é estática, podendo mudar ao longo dos meses ou anos, ou quando surgem novos tratamentos. Denomina-se asma grave casos que requerem o uso de altas doses de corticoide inalatório (ICS) mais beta-2 agonista de curta duração (LABA) ou que se mantém não controlada mesmo com o tratamento (Bousquet *et al.*, 2010; Wenzel, 2012; Campo *et al.*, 2013).

Os fatores de risco para exacerbações são:

- Necessidade de intubação por causa da asma
- Sintomas de asma não controlados
- Ter tido ≥ 1 exacerbação nos últimos 12 meses
- VEF₁ baixo (medir a função pulmonar no início do tratamento, depois de 3 a 6 meses para avaliar o melhor valor pessoal e periodicamente depois disso)
- Técnica incorreta de uso do inalador e/ou baixa adesão ao tratamento
- Tabagismo
- Obesidade, gravidez, eosinofilia sanguínea

Figura 2 - Fatores de riscos para exacerbação na asma (GINA, 2018)

O tratamento da asma esta baseado no nível do controle da doença (Figura 3). Divididos em 5 etapas

Etapa 1 - Apresenta sintomas menos de 2 vezes por mês, sem fatores de risco. **Tratamento:** beta-2 agonista de curta duração (LABA) conforme necessidade.

Etapa 2 - Apresenta sintomas menos 2 vezes por mês com fatores de risco ou de duas vezes por mês a 2 vezes por semana. **Tratamento:** dose baixa de medicação de controle + SABA inalatório conforme a necessidade.

Etapa 3 - Apresenta sintomas mais de 2 vezes por semana.

Tratamento: um ou dois medicamentos de controle + medicamento inalado de alívio conforme a necessidade.

Etapa 4 - apresenta sintomas a maioria dos dias da semana.

Tratamento: dois ou mais medicamentos de controle + medicamento inalado de alívio conforme a necessidade

Etapa 5 - apresenta sintomas de exacerbação e asma não controlada.

Tratamento: dois ou mais medicamentos de controle + medicamento inalado de alívio conforme a necessidade e tratamento adjuvante.

Figura 3 - Etapas de tratamento baseado nos sintomas clínicos (GINA, 2018)

1.3 Epidemiologia

Segundo GINA (2018) estima-se que 300 milhões de pessoas são afetados pela asma no mundo. A prevalência da asma (inclusive a da asma grave) é alta em vários países, com impacto relevante na saúde pública global (Lai *et al.*, 2009).

Considerada como um problema de saúde pública, a asma atinge pessoas de todas as idades e etnias (GINA, 2018). As populações com maior prevalência de asma (> 20% em crianças) estão em países de língua inglesa e na América Latina. O impacto da asma nesses países é geralmente complicado pelo acesso limitado aos serviços de saúde e medicamentos essenciais (Mallol *et al.*, 2017).

Barnes (2013) fez um levantamento da frequência de asma geral, mostrando que de 5% a 10% da população com diagnóstico, são classificados como asma grave ou de difícil controle, com maiores riscos de apresentar exacerbações. Entretanto essa população de pacientes tem representado um desafio, no sentido de caracterizar quais fenótipos podem estar associados (Bousquet *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que esses pacientes consomem grande parte dos recursos investidos no cuidado do asmáticos, sendo importante alvo de investigação (Wenzel, 2012; Scott *et al.*, 2016)

No Brasil, a asma atinge cerca de 6,4 milhões de pessoas acima de 18 anos de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS). As internações hospitalares em virtude de doenças respiratórias são um desfecho negativo na qualidade de vida dos pacientes e no sistema público de saúde (Cardoso *et al.*, 2017). Pesquisa no DATASUS (2016), mostrou que o Brasil tem mais de 120.000 hospitalizações por asma por ano. No entanto, houve uma redução de 36% das internações hospitalares por asma durante o período analisado de 2008 a 2013 (Cardoso *et al.*, 2017).

A média de custo de uma hospitalização no Brasil é de aproximadamente 160,00 USD baseado no valor pago pelo SUS e não reflete o valor montante pago pelos outros hospitais (Cardoso *et al.*, 2017). Uma revisão

sistemática recente dos custos da asma grave no Brasil mostrou que as principais despesas diretas estavam relacionadas com hospitalizações e medicamentos e que foram gastos 733,00 USD por paciente por ano, o que ressalta os elevados custos econômicos da asma (Cardoso *et al.*, 2017).

A mortalidade da asma no Brasil ainda é alta. Embora tenha havido uma pequena redução (de 10%) do total de óbitos de 2008 para 2013, aproximadamente 5 pacientes morrem de asma diariamente no Brasil.

Cardoso, Roncada *et al.* (2017) avaliaram o índice de mortalidade da asma em pacientes hospitalizados foi de aproximadamente 0,5%, com aumento de 25% durante o período de estudo. Porém, evidências recentes sugerem que o controle da asma ainda está abaixo do ideal, especialmente naqueles com asma grave, mesmo com recentes avanços na compreensão da epidemiologia, fisiopatologia e manejo terapêutico da doença (Price *et al.*, 2014).

1.4 Fisiopatologia da asma

Sabe-se que o processo inflamatório na asma é predominantemente eosinofílico e cursa com hiperresponsividade brônquica (Hogan, 2007; Fahy, 2009). Porém esse perfil inflamatório não tem respondido algumas perguntas no mundo científico, principalmente na população de fenótipos de asma grave (Galli e Tsai, 2008; Fahy, 2009).

Indivíduos que tem asma refrataria, apresentam padrão inflamatório neutrofílico e obstrução persistente das vias aéreas comparados com indivíduos que não tem obstrução persistente e cursam com padrão eosinofílico (Fahy, 2009). Porém, a resposta inflamatória na asma, vai além do envolvimento dos

eosinófilos ou neutrófilos. Após o contato com alérgeno, ocorre uma resposta inflamatória alérgica que resulta em interações complexas de células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas e constitui-se como o mais importante fator fisiopatológico da asma (Galli e Tsai, 2008).

Na resposta inicial caracterizada como imediata, os alérgenos inalados entram em contato com a mucosa respiratória e são capturados por células dendríticas presentes no epitélio brônquico. Estas células são capazes de reconhecer, processar o antígeno e apresentar aos linfócitos T auxiliares (Schwartz, 2002). Estes vão liberar mediadores e recrutar células inflamatórias para o pulmão. Após essa liberação e cascata de eventos, ocorre a transformação de células T CD4⁺ em diferentes perfis. As interleucinas (IL) IL-4, IL-5 e IL-13 induzem a proliferação de células efetoras de perfil T helper 2 (Th2), INF-gama e IL-2 para células de perfil T helper 1 (Th1) e TGF-beta e IL-6 para perfil Th17 (Fahy, 2009; Poon *et al.*, 2012; Ubel *et al.*, 2014).

A IL-4 é principal responsável por estimular a produção de imunoglobulinas (IgE) por linfócitos B, além de aumentar a proliferação de mastócitos, ativam e aumentam a sobrevivência de eosinófilos. Sabe-se que o aumento de IgE amplifica as respostas inflamatórias alérgicas (Hawrylowicz, 2005; Lloyd e Hessel, 2010). Estudos mostram que os mastócitos contêm proteoglicanos e podem também contribuir com a resposta inflamatória por intermédio da liberação de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IL-4, IL-5, histamina, cisteinil leucotrienos e prostaglandinas (Buc *et al.*, 2009; Lemanske e Busse, 2010). Embora os mastócitos liberem histamina e prostaglandina (PG)D₂,

os leucotrienos parecem ser os principais mediadores responsáveis pelas alterações encontradas nesta fase (Lemanske e Busse, 2010).

A IL-5 tem um papel importante no recrutamento de eosinófilos para via aérea e IL-13 medeia a indução da hiperresponsividade brônquica, hiperplasia de células *goblet* e produção de mucina (Hamid e Tulic, 2009). A liberação dessas células e mediadores celulares, induzem contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudação de plasma, que pode comprometer a integridade epitelial (**Figura 4**) (Hawrylowicz, 2005; Galli e Tsai, 2008).

A fase tardia é caracterizada com o recrutamento de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e também linfócitos e monócitos). Ocorre entre 3 a 6 horas após a exposição antigênica e pode durar vários dias. Os leucócitos liberam mediadores para endotélio (**Figura 4**) (Bousquet *et al.*, 2010). Os eosinófilos são recrutados a partir da medula óssea e do sangue periférico para os locais da inflamação e quando ativados liberam fatores (por exemplo, a proteína básica principal e a proteína catiônica eosinofílica) e metaloproteinases, que também causam danos ao epitélio (Husain *et al.*, 2005). Vignola e Gagliardo (2000) mostraram que além dessas substâncias, ocorre a liberação de

leucotrienos produtos do metabolismo oxidativo que danificam o tecido pulmonar e amplificam a inflamação.

Figura 4 - Fase imediatas e tardia envolvidas no processo fisiopatológico da asma alérgica. (Adaptado de *Robbins e Cotran Pathologic basis of disease*, 2005).

Existe outro subtipo de células T, chamadas de T helper 17 (Th17). Muito estudada nas doenças como: psoríase, esclerose múltipla entre outras doenças auto-imune, no entanto, existem alguns trabalhos mostrando o envolvimento desse perfil em doenças inflamatórias alérgicas (Roussel *et al.*, 2010; Halwani *et al.*, 2013; Normanton e Marti, 2013).

Chou *et al.* (2017) mostraram que perfil Th17 está envolvido no recrutamento neutrofílico e modula citocinas envolvidas no perfil Th2. Alguns trabalhos tem demonstrando que a IL-17 induz a resposta inflamatória tecidual, sendo um fator determinante para a modulação das alterações estruturais pulmonares (Doe *et al.*, 2010; Lloyd e Hessel, 2010; Kudo *et al.*, 2012; Way *et*

al., 2013). Portanto investigar o papel dessa citocina e sua ação parece contribuir para fisiopatogenia da asma.

1.5 Asma e o perfil Th17

A via Th2 foi identificada há mais de 25 anos, e parece ser a principal via fisiopatológica na asma. Os pacientes com asma de perfil predominante Th2 tendem a responder regularmente à terapia clássica. Além disso, os pacientes nesse subgrupo com asma grave podem ser controlados com terapias novas como anticorpos monoclonais direcionados contra IgE, IL-5, IL-13, IL-4 ou seus receptores (Woodruff *et al.*, 2009; De Boever *et al.*, 2014). Por outro lado, os pacientes com baixo predomínio de resposta Th2 representam um subgrupo de pacientes com necessidades clínicas que não respondem a essas terapias (De Boever *et al.*, 2014).

Pacientes asmáticos graves apresentam fenótipos diferentes sendo responsáveis por manifestarem diferentes padrões de inflamação que não podem ser explicados apenas pela resposta imune Th2. Estes pacientes geralmente apresentam a inflamação neutrofílica brônquica (De Boever *et al.*, 2014).

A IL-17 (anteriormente conhecida como IL-17A) é uma citocina pro-inflamatória importante da via Th17 e foi identificada pela primeira vez em 1993. Está envolvida na inflamação neutrofílica e nos processos de remodelamento pulmonar (Bullens *et al.*, 2006; Al-Ramli *et al.*, 2009).

A citocina IL17 faz parte de uma população distinta de células T CD4 + compostas por seis membros designados de IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E

(também chamado IL-25) e IL-17F, foram descobertos dentro de um curto período de tempo desde 2000 até 2002. Sabe-se que essa interleucina desempenha funções na imunidade contra fungos e bactérias extracelulares (Fajt, 2016).

Estudos sugeriram que a IL-17A e F estão envolvidas na fisiopatogenia da asma, sendo necessária maior compreensão do significado desse subgrupo, a fim de descobrir os mecanismos moleculares envolvidos na asma. Nas doenças pulmonares sabe-se que a IL-17A e IL-17F são altamente pró inflamatórias e agravam a resposta inflamatória neutrofílica subjacente (Eustace *et al.*, 2011; Wegmann, 2011; Way *et al.*, 2013).

Além das células CD4+ a IL-17A e F podem ser liberadas por neutrófilos, eosinófilos, células T CD8+, basófilos e mastócitos (Nembrini *et al.*, 2009). Ambas citocinas podem induzir a expressão de uma variedade de outros mediadores pró-inflamatórios em células endoteliais epiteliais e vasculares, fibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, incluindo IL-6, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF e GM-CSF) e as quimiocinas está CXCL10 e CXCL8.

Sendo responsável por recrutamento de neutrófilos no pulmão, a indução da quimiocina CXCL8, produz uma potente resposta inflamatória neutrofílica pulmonar (Nembrini *et al.*, 2009).

Corroborando esses aspectos, evidências em modelo animal, demonstram que a sensibilização com ovoalbumina e baixas doses de lipopolissacarídeo (LPS), induz uma resposta de perfil Th17 promovendo o recrutamento de neutrófilos nas vias aéreas e a hiperreatividade (Wilson *et al.*,

2009; Starkhammar *et al.*, 2012). Os animais com deficiência de IL-17F e IL-17A tiveram diminuição de IL-6 e uma resposta diminuída do recrutamento de neutrófilos (Yang *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2017).

A IL-17 também participa do processo de remodelamento. Estudos mostram que essa citocina induz a expressão de TGF- β nas células endoteliais (Starnes *et al.*, 2010). TGF- β é uma citocina profibrótica e tem sido implicada nas alterações da matriz extracelular (Hebel *et al.*, 2011). As células Th17 contribuem para o remodelamento pulmonar por intermédio da expressão excessiva de muco. Esses achados sugerem o potencial envolvimento da IL-17 no processo de remodelamento das vias aéreas (Chakir *et al.*, 2003).

Nos seres humanos há evidências que sugerem um aumento na expressão de IL-17A e IL-17F na asma moderada a grave (Chakir *et al.*, 2003; Al-Ramli *et al.*, 2009). No entanto, essa expressão está associada a inflamação granulocítica na parede da via aérea ou lúmen ainda é incerto. Outros trabalhos tem mostrado o aumento dessa citocina no escarro de pacientes asmáticos graves, e esse aumento está relacionado com infiltração neutrofílica e com grau de hiperresponsividade das vias aéreas (Wang *et al.*, 2011; Wang e Wills-Karp, 2011; Barnes, 2013; Ubel *et al.*, 2014).

Kudo *et al.* (2012) mostraram que a IL-17A, contribui para inflamação alérgica, pois está envolvida nas vias de sinalização, NF- κ B e RhoA e ROCK2 sendo responsável por aumentar diretamente as respostas contráteis das células do músculo liso das vias aéreas. Assim, IL-17A, NF κ B e efetores dessa via podem ser atrativos alvos terapêuticos para o tratamento da inflamação pulmonar (Kudo *et al.*, 2012).

Há controvérsias a respeito do papel da IL-17 no pulmão devido sua função na defesa do hospedeiro contra patógenos, pois o bloqueio dessa citocina pode aumentar a vulnerabilidade a infecções sendo responsáveis na defesa do organismo contra vírus, fungos e bactérias através de efeitos diretos sobre a estrutura das células pulmonares, a IL-17 também atua indiretamente nesta defesa, por intermédio do recrutamento de neutrófilos (Alcorn *et al.*, 2010).

Mintz-Cole *et al.* (2012) mostraram um papel protetor da IL-17, e a neutralização da IL-17 resultou em aumento da hiperreatividade das vias aéreas e infiltração eosinofílica após exposição ao *Aspergillus versicolor*, um fungo comumente associado com a indução da asma.

Porém, são necessários mais estudos para elucidar o papel da IL-17 no pulmão e verificar os efeitos de estratégias terapêuticas inibindo esse perfil, considerando a possibilidade de que possa ser uma nova abordagem para o tratamento da asma grave de difícil controle (Alcorn *et al.*, 2010; Besnard *et al.*, 2012).

Apesar de estudos prévios demonstrarem a participação da IL-17 na hiperresponsividade das vias aéreas e remodelamento em modelos experimentais de inflamação, ainda não existem estudos avaliando a participação desta citocina no parênquima pulmonar, incluindo a via de estresse oxidativo, modulação de células apresentadoras de antígenos, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, além de seus efeitos nos proteoglicanos e glicoproteínas presentes no pulmão. Por fim, também não foi avaliado o efeito dessa terapêutica em modelo de asma exacerbado por LPS.

1.6 Quimiocinas e seu papel na asma

As quimiocinas foram descritas em 1992 (Lindley e Walker, 1993) e constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos, apresentando algumas similaridades e diferenças com as citocinas. Assim como as citocinas, as quimiocinas são proteínas produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução e exercem seus efeitos localmente (Baggiolini, 2001).

As quimiocinas são de baixo peso molecular (8-12 kDa) com, aproximadamente 70 a 80 aminoácidos. Existem mais de 50 quimiocinas, sendo que todas têm estruturas terciárias similares, que consistem num terminal amina (que atua como domínio de sinalização), seguido de uma longa alça (que contém importantes determinantes de ligação), três folhas β e uma hélice C-terminal. A maioria das quimiocinas tem quatro cisteínas (Baggiolini e Moser, 1997).

De acordo com o número e espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade N-terminal, são classificadas em quatro subfamílias: CXC, CC, CX3C e C, onde C representa cisteína e X ou X3 representa um ou três aminoácidos^{1,3,4}. Também podem ser representadas pelas letras do alfabeto grego α , β , γ e δ . Os receptores das quimiocinas pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteínas G. Ainda que reconheçam mais do que uma quimiocina, os receptores estão praticamente sempre restritos a uma única subfamília (Baggiolini, 2001).

Lloyd (2000) demonstram que a subfamília CC, também conhecidas como beta-quimiocinas, representam quimiocinas que ativam monócitos,

linfócitos, eosinófilos e basófilos. Consequentemente, são importantes moduladoras dos processos de inflamação crônica e alérgica. Também contribuem para a proliferação de células hematopoiéticas e estão envolvidas na migração de células tumorais. Dentre as quimiocinas da família CC a TARC (*Thymus and Activation-regulated chemokine*) pode ser produzida por monócitos principalmente estimulados por citocinas de perfil Th2 ou pelas células dendríticas. Sendo assim exerce um papel chave de modulação dos processos inflamatórios (Abelius *et al.*, 2011; Holgate, 2012).

Berin (2002) mostrou em modelos de ratos com inflamação alérgica que a neutralização do TARC inibiu a infiltração de células T e eosinófilos no pulmão e da hiperreatividade brônquica. O mecanismo exato pelo qual o TARC pode participar da inflamação alérgica e o que desencadeia a expressão de TARC após a exposição ao alérgeno ainda é desconhecido. Estudos sugerem que este poderia estar envolvido não apenas na asma alérgica, mas na patogênese das doenças alérgicas mediadas por Th2 um modo geral.

Existem outras quimiocinas que são ativadas no processo de inflamação alérgica, por exemplo a eotaxina, que é expressa em células epiteliais. Lukacs (1999) demonstraram que essa quimiocina é responsável pelo recrutamento de eosinófilos para via aérea, sendo importante moduladora na resposta inflamatória alérgica.

Porém, não existem estudos avaliando o TARC no parênquima pulmonar, em modelos de inflamação alérgica crônica e sua interação em modelos de exacerbação por LPS. Também não está estabelecida sua modulação pela IL-17.

1.7 Remodelamento

O processo inflamatório na asma envolve muitas células inflamatórias, mediadores inflamatórios tais como as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que resultam em uma inflamação crônica das vias aéreas e acabam desencadeando a broncoconstrição e alterações estruturais, chamado de remodelamento pulmonar (Al-Muhsen *et al.*, 2011). O remodelamento ocorre devido a processo de reparação tecidual, frente um dano de lesão. Estas adaptações teciduais contínuas desencadeiam alterações de estrutura, geometria e propriedades teciduais (James, 2005).

Sendo considerado a principal causa dos sintomas associado a diminuição da função pulmonar, o remodelamento é iniciado como um processo de reparação em resposta às lesões das vias aéreas induzidas pela inflamação (Lazaar e Panettieri, 2003). No entanto, a falta de equilíbrio entre o processo de lesão e cicatrização conduz ao remodelamento tecidual (Postma e Timens, 2006). Este fato justifica o porquê de alguns pacientes asmáticos apresentarem perda parcial e irreversível da função respiratória ao longo do tempo, principalmente pacientes asmáticos graves que tem declínio da função pulmonar de forma acelerada com curso da doença (Cohn *et al.*, 2004).

Clinicamente, o remodelamento pulmonar leva a uma diminuição da resposta terapêutica farmacológica e ou agravamento progressivo dos sintomas no decorrer da evolução da doença (Chakir *et al.*, 2003; Kaminska *et al.*, 2009).

As alterações do remodelamento consistem em aumento da espessura da membrana basal reticular subepitelial (RBM), aumento da

espessura do músculo liso das vias aéreas (ASM), angiogênese e hiperplasia de células caliciformes que estão associados a uma perda irreversível da função pulmonar (Tai *et al.*, 2014). (Figura 2).

Biopsias de pulmões de asmáticos mostraram que os fibroblastos das vias aéreas são morfologicamente distintos dos fibroblastos do parênquima pulmonar. Os fibroblastos do parênquima distal são mais largos, com aparência estrelada e com mais projeções citoplasmáticas e os fibroblastos das vias aéreas sintetizam mais pró-colágeno tipo I após estímulo com TGF- β (Kotaru *et al.*, 2006). Este estudo sugere que dois tipos de fibroblastos existem no pulmão.

Estas diferenças estruturais podem explicar, pelo menos parcialmente, que frente a um estímulo lesivo, ocorra diversidade de resposta de reparação observada em vias aéreas proximais e distais no pulmão e no parênquima de pacientes asmáticos e com outras doenças respiratórias.

O parênquima pulmonar pode produzir muitas citocinas de perfil Th2, quimiocinas e mediadores que estão envolvidos na iniciação e na perpetuação do processo inflamatório (Nakamura *et al.*, 1999; Benayoun e Pretolani, 2003; Manuyakorn *et al.*, 2013). Essas interações do parênquima pulmonar com o processo inflamatório, levam a lesões e dano tecidual da mesma forma que é observado nas vias aéreas proximais, ocorrendo o remodelamento do parênquima distal (Angeli *et al.*, 2008; Righetti *et al.*, 2014).

Modelos experimentais de asma alérgica crônica em camundongos e cobaias mostram a existência de aumento da produção de colágeno, hipertrofia e hiperplasia das vias aéreas e aumento da produção de muco tanto na via aérea

como no parênquima pulmonar (Prado *et al.*, 2006; Arantes-Costa *et al.*, 2008; Toledo *et al.*, 2012; Righetti *et al.*, 2014).

Produzido pela citocina TGF- β , o colágeno é um marcador potencial de remodelamento na asma (Burgess *et al.*, 2016). Já foi documentado que na asma grave, há aumento da deposição de colágeno I e III e V em biópsias brônquica (Benayoun e Pretolani, 2003; Chakir *et al.*, 2003). Além do seu envolvimento no processo inflamatório, a citocina TGF- β também está envolvida nas mudanças observadas na matriz extracelular, estimulando a produção de fibroblastos, colágenos tipo I e III, fibronectina e proteoglicanos (Burgess *et al.*, 2016).

A espessura da membrana basal reticular na asma é determinada pela proporção de deposição em curso e degradação de proteínas, incluindo colágenos I, III e V, fibronectina, tenascina, lumican e biglicano. Esses componentes são provavelmente secretados pela ativação de fibroblastos e miofibroblastos, principalmente por causa da sinalização do TGF- β (Redington e Howarth, 1997; Michalik *et al.*, 2009). As fibras colágenas são os elementos mais abundantes da matriz extra celular (MEC) no pulmão, constituindo aproximadamente 70% do interstício pulmonar (Turino, 1985). Qualquer

alteração na estrutura, quantidade ou na geometria de sua distribuição, pode desencadear alterações na função pulmonar (Lagrué *et al.*, 1986).

Figura 5 - Processo de remodelamento. Mecanismos fisiopatológicos na asma representados pelas interações entre células inflamatórias. A importância das células tipo Th1, Th2 e Th17 é demonstrado pela contribuição de citocinas Th2, IL - 4, IL - 5 e IL - 13 mostrando inflamação eosinofílica e produção de IgE, citocinas Th17, IL-6, IL-8 e TGF- β e as células Th1 consideradas como inflamação não eosinofílica, caracterizado-se inflamação neutrofílica. A presença das metaloproteinases, MMP-9 e MMP12, fatores de crescimento e os prótêoglicanos. A caixa laranja representa atividades no linfonodo. As células dendríticas processa antígenos, migra para o nódulo linfático e se associa com TH0, que então diferencia e migra de volta para a via aérea. A- inflamação não eosinofílica e B inflamação eosinofílica. (adaptado J Allergy Clin Immunol. Janeiro 2014)

Os principais componentes da MEC são: as fibras elásticas, colágenas, os proteoglicanos, as glicoproteínas e as metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMPs) (Holgate, 2012; Manuyakorn *et al.*, 2013). Considerados importante no processo de remodelamento, os proteoglicanos (decorina, biglicano e lumican) desempenham um papel na interação das fibrilas e fibrogênese de colágeno no tecido e com outros componentes da matriz extracelular (Kalamajski e Oldberg, 2010).

Neste aspecto, pode-se especular que o aumento da expressão de decorina em pacientes com asma grave pode ser um mecanismo de proteção para modular o remodelamento pulmonar. Por outro lado, uma quantidade aumentada de decorina poderia regular e estabilizar o espaçamento do colágeno e criar uma matriz de colágeno mais rígida, que pode afetar a elasticidade geral do tecido pulmonar (Kalamajski e Oldberg, 2010).

Na asma, os níveis de fibronectina, juntamente com o colágeno I e III, estão aumentados no músculo liso da parede das vias aéreas (Araujo *et al.*, 2008). Outras anormalidades na deposição na estrutura da matriz das vias aéreas na asma incluem um aumento específico da isoforma lumican que também está associada a lesão tecidual e com a gravidade da asma (Pini *et al.*, 2007).

As metaloproteases tem um papel importante durante o processo de remodelamento. Produzidas por macrófagos, neutrófilos e eosinófilos as MMPs (MMP-9 e MMP-12) podem degradar componentes da matriz extracelular (**Figura 5**), além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios, potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido

cicatricial (Tillie-Leblond *et al.*, 2005). Uma vez formadas, as MMPs ativadas são rapidamente inibidas por uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteinases (TIMP), que são produzidos pela maioria das células mesenquimais, impedindo assim, a ação descontrolada dessas proteinases (Gueders *et al.*, 2005).

Righetti *et al.* (2014) mostraram em modelo de inflamação alérgica crônica o aumento de MMP-9 e TIMP-1 no parênquima distal, mostrando a importância do parênquima durante o processo de remodelamento.

Mesmo o remodelamento sendo um processo que pode prejudicar a função pulmonar, acredita-se que ocorra na tentativa de proteção de agressão inflamatória pulmonar. Alguns estudos mostraram que sem o remodelamento o paciente seria ainda mais acometido pelos sintomas e teria declínio mais rápido da função pulmonar (James e Wenzel, 2007).

1.8 Estresse oxidativo

Há muito tempo o NO foi demonstrado como uma molécula essencial para as funções biológicas do corpo humano, mas somente em 1998 suas funções e interações com as doenças foram mais bem elucidadas (Bell, 2004). A importância do estresse oxidativo na patogênese e progressão da asma tem despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica (Chan-Yeung e Becker, 2006).

O processo de estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a formação e a remoção de agentes oxidantes no organismo, proveniente da

geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou da diminuição da produção ou ação dos antioxidantes endógenos (Li *et al.*, 2003).

O óxido nítrico (NO) no sistema respiratório é produzido por variedades de células, incluindo células do sistema vascular e as células que participam do processo inflamatório por exemplo, neutrófilos, macrófagos e mastócitos (Ricciardolo, 2003). Essa molécula é considerada um radical livre e apresenta um elétron ímpar que é capaz de reagir com outras moléculas como o oxigênio (O_2), radicais superóxidos (O_2^-) ou metais de transição, formando os compostos reativos nitrogenados, que exercem funções fisiológicas e na destruição de microorganismos (Ricciardolo, 2003).

O NO é formado a partir de três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS): a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Fischer *et al.*, 2002).

Sendo as formas nNOS e eNOS constitutivas (cNOS) e estando presentes normalmente em situações fisiológicas, essas são consideradas como enzimas cálcio-dependentes, produzem uma pequena quantidade de óxido nítrico. Acredita-se que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma por causar relaxamento na musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC. No entanto, o NO derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação nas arteríolas, com consequente extravasamento de plasma e edema (Kobayashi, 2006).

Outra forma é iNOS que é uma isoforma formada através dos estímulos de citocinas pró-inflamatórias é expressa em alguns tipos de células

inflamatórias como já relatado acima. Uma vez formada essa isoforma leva a vasodilatação pulmonar, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th1/Th2, contribuindo para os sinais e sintomas característicos da asma (Ricciardolo, 2003).

Alguns estudos em modelo animal de inflamação alérgica crônica, mostraram a participação do óxido nítrico no processo inflamatório, tanto na via aérea como no parênquima pulmonar, demonstrando que existe um aumento da expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presentes nas vias aéreas distais. A isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias (linfomononucleares e eosinófilos) e o número de células que expressa esta isoforma é maior nos animais sensibilizados com ovoalbumina (Prado *et al.*, 2005; Angeli *et al.*, 2008; Righetti *et al.*, 2014; Pigati *et al.*, 2015).

A iNOS é induzida por citocinas, lipossacarídeos e agentes oxidantes, resultando em maiores quantidades de formação de NO (**Figura 6**). As células inflamatórias e as células do epitélio respiratório após a exposição ao estresse oxidativo, geram superóxidos (O_2^-). Por intermédio da ativação da nicotaminada adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase são formadas altas quantidades de NO por aumento da expressão de iNOS. Portanto, na presença de radicais livres de oxigênio o NO reage com o superóxido levando a uma maior produção de peroxidonitrito ($ONOO^-$) (Squadrito e Pryor, 1998). O peroxidonitrito ($ONOO^-$) é altamente citotóxico, sendo responsável por induzir hiperresponsividade nas vias aéreas, inibir a produção de surfactante pulmonar, aumentar a permeabilidade vascular, causar danos às células epiteliais

pulmonares, inibir função enzimática, causar danos no ácido licocorticóides, induzir peroxidação lipídica e aumentar a susceptibilidade celular à radiação, metais tóxicos e agentes quimioterápicos (Rodway *et al.*, 2009).

Assim, o estresse oxidativo é um importante fator para a amplificação da inflamação na asma (Shiraki *et al.*, 2009). O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva à peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (Morrow, 2006). Os isoprostanos possuem uma potente atividade biológica e são responsáveis pela modulação de certos aspectos da lesão oxidativa (Milne *et al.*, 2008).

Os isoprostanos são produzidos via peroxidação do ácido araquidônico, em uma reação catalisada por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Morrow, 2006). Estes componentes são úteis biomarcadores para o estresse oxidativo, estando os isoprostanos aumentado nos níveis séricos, urina, ar exalado e fluido do lavado broncoalveolar (Montuschi *et al.*, 1999).

A via de formação dos isoprostanos tem capacidade para produzir 64 estruturas isoméricas, das quais o 8-iso-PGF₂ α é o melhor caracterizado (Morrow, 2006). O 8-iso-PGF₂ α é um isômero de PGF₂ α com efeitos contráteis por intermédio de ligação a receptores tromboxane A₂ no músculo liso das vias aéreas (Janssen *et al.*, 2000). Este agente causa aumento da resistência pulmonar, indicando que o 8-iso-PGF₂ α na via do estresse oxidativo pode ser um dos mediadores da limitação ao fluxo aéreo na asma, embora outros mediadores também exerçam esta função (Shiraki *et al.*, 2009).

Figura 6 – Esquema mostrando a via do estresse oxidativo e a participação do isoprostanos

1.9 Vias sinalizadoras NF- κ B e Rho quinase na asma

O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50 (Chen *et al.*, 1999). O termo NF κ B designa a combinação p50/RelA. Além dessas, outras subunidades foram descritas, tais como a c-Rel, RelB, e p52, sendo provável que diferentes tipos de combinações sejam capazes de ativar diferentes genes ou ainda bloquear a transcrição do p50/RelA. As subunidades p50 e p52, sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente, formam homodímeros inibitórios da transcrição, pois ligam-se a regiões promotoras sem exercer atividade, bloqueando a interação desses genes com o dímero ativo p50/RelA (Ghosh *et al.*, 1998)

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

O fator de transcrição NF κ B é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados (Xiao, 2004).

Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF κ B. Quando não estimulado, o fator NF κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B (**Figura 7**) são necessárias para que ocorra a translocação (Tripathi *et al.*, 2006). De acordo com Gagliardo *et al.* (2003), a ativação exagerada de NF κ B perpetua a produção de mediadores inflamatórios em asma grave. Existem um ou mais locais para a ligação de NF κ B, proteínas que são reguladas

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

Figura 7 - Esquema mostrando ativação do NF-κB e sua ligação no estresse oxidativo.

Righetti *et al.* (2014) avaliando um modelo experimental de inflamação alérgica crônica, mostraram a presença dessa via ativa no parênquima pulmonar de animais sensibilizados com ovalbulmina, evidenciando a importância inibir ou controlar essa via a fim de evitar interações com outros mecanismos que exacerbam os sintomas da asma.

A respeito da proteína Rho, foi descoberta em 1985, mas estudada profundamente somente após 1991, essa proteína foi identificada como constituinte da superfamília Ras de GTPases monoméricas. Essa proteína exerce regulação em diversas atividades celulares, tais como quimiotaxia, adesão e controle no crescimento e migração celular. Para todas estas atividades a proteína Rho possui uma proteína efetora denominada Rho-quinase (Fukata *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2005; Taki *et al.*, 2007).

Dentre as principais funções fisiológicas da Rho-quinase estão a contração, migração e proliferação celular. Acredita-se que estas ações possam estar relacionadas a características da asma, incluindo limitação ao fluxo aéreo, hiperresponsividade das vias aéreas, dessensibilização beta-adrenérgica, recrutamento de eosinófilos e remodelamento das vias aéreas (Kume, 2008).

Quanto à musculatura lisa, seu tônus é regulado primeiramente pela fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) por mecanismos que podem ou não depender das concentrações citoplasmáticas de cálcio (Ca^{2+}). Um aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} conduz a formação do complexo calmodulina que ativa a mioquinase e a fosforilação desta proteína resulta na contração na musculatura lisa. Por outro lado, a fosforilação da CLM também pode ocorrer quando ocorre a inibição da miofosfatase, atuando no aumento da fosforilação da CLM, independente das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} (Kitazawa e Somlyo, 1991).

A utilização do Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e conseqüentemente gerar a contração da musculatura lisa é denominada como “sensibilização do Ca^{2+} ” (Kitazawa e Somlyo, 1991; Shiraki *et al.*, 2009). Os mecanismos que servem de base para esta sensibilização do Ca^{2+} ainda não estão totalmente claros, mas a via Rho/Rho-quinase parece estar envolvida neste processo, atuando como inibidores da miofosfatase (Gong *et al.*, 1996; Hirata *et al.*, 1996; Kureishi *et al.*, 1999).

As duas formas de expressão da Rho-quinase, chamadas de ROCK-1 e ROCK-2, inibem a atividade da miofosfatase e promovem a atividade da mioquinase, aumentando a fosforilação e resultando no aumento do tônus

muscular (Uehata *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 1998; Kureishi *et al.*, 1999; Ishizaki *et al.*, 2000). Portanto, podemos inferir que se houver o bloqueio da sinalização da Rho por meio da Rho-quinase, poderíamos esperar que as respostas contráteis do músculo liso fossem atenuadas por meio do mecanismo de inibição da miofosfatase.

Utilizando um inibidor específico da Rho-quinase em modelo experimental de inflamação alérgica crônica, nosso grupo demonstrou resultados positivos com atenuação da inflamação eosinofílica, diminuição hiperresponsividade das vias aéreas tanto de pequeno como de grande calibre, além da redução dos marcadores do processo de remodelamento, demonstrando menor conteúdo de colágeno e fibras elásticas. Vale ressaltar que foram avaliadas essas alterações, tanto nas vias aérea proximais e no parênquima distal (vias aéreas distais e septos alveolares), mostrando a importância do envolvimento desse compartimento na fisiopatogenia da asma (Possa *et al.*, 2012; Righetti *et al.*, 2014).

1.1.1 O parênquima pulmonar e a asma

Nos anos 90 já se falavam da participação do parênquima pulmonar na perpetuação do processo inflamatório da asma, principalmente em pacientes asmáticos grave, e que as mesmas células inflamatórias, mediadores, citocinas que estavam presente nas vias aéreas, foram encontradas no parênquima pulmonar (Salerno *et al.*, 1995; Mauad *et al.*, 1996; Dolhnikoff *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1999). Porém, não é só o processo inflamatório que está presente nessa porção do pulmão, a obstrução do fluxo aéreo também se dá

pela contribuição do parênquima distal que está associado com possível remodelamento da matriz extracelular (Salerno *et al.*, 1995; Hamid *et al.*, 1997). No início do ano 2000, Tulic e Hamid (2003), conseguiram demonstrar que o volume total e a área de superfície das vias aéreas distais são muito maiores que o volume e a área de superfície das grandes vias aéreas, sugerindo que o desenvolvimento de qualquer alteração no pulmão distal em pacientes asmáticos tem um efeito importante sobre a fisiopatogenia e no tratamento da doença. No mesmo trabalho os autores alertam para a possibilidade de um tratamento paralelo da doença, uma vez que os esteroides inalatórios mais usados atualmente apresentam sua deposição principalmente nas vias aéreas centrais pouco na periferia pulmonar. Desta forma, um dos desafios terapêuticos em asma tem sido desenvolver novas tecnologias e drogas que permitam uma melhor oferta de agentes inflamatórios à porção distal do pulmão.

Corroborando com esses achados, Mauad *et al.* (2004) mostraram um aumento do conteúdo de fibras elásticas e um aumento 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 que as respostas do parênquima pulmonar têm na fisiopatogenia de anormalidades funcionais observadas em pacientes com asma.

Xisto *et al.* (2005) confirmaram o as alterações do remodelamento pulmonar periférico, um aumento do conteúdo de colágeno e de actina em modelo experimental de inflamação alérgica crônica. Estas alterações apresentaram uma correlação positiva com o aumento da resistência e elastância teciduais, evidenciando que a inflamação, as alterações mecânicas, assim como o remodelamento não ocorrem apenas nas vias aéreas, mas

também no parênquima pulmonar, levando a mudanças mecânicas *in vivo* e *in vitro*.

Considerando a importância do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, cabe ressaltar que isto altera o conceito e principalmente a forma de pensar sobre o tratamento da doença. Em 2008 nosso grupo publicou dois trabalhos, e no ano seguinte mais um, mostrando as alterações do processo inflamatório, hiperresponsividade, componentes do processo de remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo presente nas vias aéreas eram as mesmas encontradas no parênquima pulmonar em modelo experimental de inflamação alérgica crônica (Angeli *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2008; Starling *et al.*, 2009).

Considerando ainda o remodelamento e estresse oxidativo no parênquima pulmonar, recentemente, Righetti *et al.* (2014) confirmaram essas alterações, aumento na deposição de colágeno, fibras elásticas, actina e TGF- β , componentes do remodelamento da matriz extracelular, mostrando a participação das vias de sinalização, NF-kB e Rho-quinase com aumento na expressão de células positivas para NF-kB e ROCK1 e ROCK2. Neste sentido, corroboramos a importância do parênquima pulmonar na fisiopatogenia da asma.

1.1.2 O uso do LPS (lipopolissacarídeo) em modelo animal

As evidências clínicas e experimentais sugerem um papel importante para as infecções respiratórias no desenvolvimento de exacerbações na asma (Starkhammar *et al.*, 2012). Infecções respiratórias de vias aéreas superiores foram associadas com 80% de exacerbações de asma em crianças e 50% de

todos os episódios de asma em adultos (Micillo *et al.*, 2000). Considerada como grande contribuinte para os custos relacionados à asma, as exacerbações são causadas principalmente por infecções bacterianas e virais (Newcomb *et al.*, 2009; Busse *et al.*, 2010).

Agentes virais, particularmente rinovírus humano C, vírus respiratório sincicial e influenza A parecem ser as ameaças mais prevalentes e recorrentes. Porém, agentes bacterianos, em menor grau, podem desempenhar um papel importante podendo desenvolver um quadro de co-infecção e piorar o prognóstico desses pacientes (Sandrock e Norris, 2014).

A fim de estudar os efeitos das respostas inflamatórias no hospedeiro que sofre infecção bacteriana, quadro comum dos pacientes asmáticos não eosinofílico, os modelos experimentais contribuem com importantes informações a esse respeito e permitem a elaboração de novas estratégias terapêuticas (Hussain e Kline, 2001).

O uso de LPS (lipopolissacarídeo) fornece essas informações. Conhecido como endotoxina, é uma molécula derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas (Tuin *et al.*, 2006). Composto por bicamada lipídica (lipídio A) e uma cadeia de dissacarídeo, o LPS é um importante ativador da resposta inata imune via receptor Tol Like 4 (TRL4) e tem pouca toxicidade quando utilizado diretamente em células (*in vitro*). Atualmente, LPS é considerado o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias gram-negativas (Rietschel *et al.*, 1994).

O reconhecimento do LPS é mediado ainda por outras moléculas como LBP, a proteína ligante de LPS (do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*), a proteína CD14 que pode estar sobre a forma solúvel na circulação ou ancorada à membrana celular (sCD14 e mCD14, respectivamente) e ainda a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) que também pode ser encontrada nas duas formas. As proteínas LBP, MD-2 e CD14 na versão solúvel atuam como proteínas auxiliares, responsáveis por transferir LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2 (Shimazu *et al.*, 1999; Akira e Takeda, 2004). Esse complexo é considerado como a principal forma de reconhecimento do LPS (**Figura 8**).

Figura 8 - Via de ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NF-κB e de outros fatores de transcrição. (Adaptado Villar J. Crit Care 2004)

Nos últimos anos para a reprodução de modelos de lesão pulmonar aguda (LPA) tem sido utilizada a administração de LPS (Petroni *et al.*, 2015; Venancio *et al.*, 2016). Sendo considerado dose-dependente, os modelos que utilizam LPS a fim de estudar as respostas inflamatória do hospedeiro que sofre

infecção bacteriana, tem utilizado doses de 5 mg/kg ate 100 mg/kg (Tang *et al.*, 2014; Abdelmageed *et al.*, 2015; Fodor *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017).

Fodor *et al.* (2016) utilizaram doses crescentes de LPS (3, 5, 10 mg / kg) em modelos experimentais em ratos para quantificar a gravidade do efeito dose-dependente. Os autores concluíram que os achados confirmaram a sepse e o dano da membrana alveolar-capilar de uma maneira dependente da dose e do tempo de exposição.

Em modelos experimentais de inflamação alérgica associado ao LPS é pouco relatada. Lowe *et al.* (2015) utilizaram um modelo experimental de inflamação alérgica associado a inalações repetidas de LPS. O grupo mostrou que a exposição ao LPS exacerba as respostas inflamatórias e leva a hiperresponsividades das vias aéreas, além de diminuir a sensibilidade ao corticosteróide.

Starkhammar *et al.*(2012) utilizaram um modelo experimental com baixa dose de LPS (0,1 mg / ml) e demonstraram aumento da hiperreatividade das vias aéreas e ativação de inflamação neutrofílica.

Corroborando com esses achados, Bae *et al.* (2017) utilizando um modelo knockout para IL-17A, verificaram diminuição de IL-6, neutrófilos e ausência de IL-17A. No entanto, quando compararam com modelo experimental de inflamação alérgia induzida por ovoalbumina associado ao LPS, observaram um aumento de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-17 em camundongos sensibilizados com ovoalbumina e LPS.

Baseado nesses dados, acreditamos que o modelo experimental de inflamação alérgica crônica, associado a baixa dose de LPS é útil para provocar uma resposta exacerbada, simulando o que ocorre nos pacientes asmáticos graves, a fim de fornecer respostas sobre os mecanismos reguladores e moduladores do perfil Th17 e seu envolvimento com a asma.

1.1.3 Inibidor da IL-17

Estudos prévios envolvendo anticorpos monoclonais anti-IL-17 demonstraram a influência potencialmente benéfica destas drogas em alguns aspectos da fisiopatogenia de doenças pulmonares inflamatórias agudas e crônicas (Schnyder-Candrian *et al.*, 2006; Barlow *et al.*, 2011). Nas doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide e psoríase os efeitos positivos dessa terapia também têm sido documentados (Sarkar *et al.*, 2009; Hueber *et al.*, 2010; Puig, 2017).

Corroborando com esses achados, em modelo animal Gu et al. (2017), utilizaram o anti-IL-17 em rinite alérgica, após repetidas inalações com OVA. O bloqueio dessa via foi capaz de diminuir a infiltração de eosinófilos e neutrófilos, redução das respostas de Th2 e Th17.

Recentemente, Weathington et al.(2017) mostrou que IL-17E está ligada a via de sinalização NF- κ B e o bloqueio dessa citocina com anti-IL-17, foi capaz de suprimir a ativação dessa via de sinalização, além de diminuir as respostas de citocinas do perfil Th2.

Em estudos clínicos em humanos, o uso brodalumab (anti-IL-17), mostrou efeitos positivos nas doenças auto-imunes, porém na asma existe

apenas um estudo em humanos que utilizaram o anti-IL-17 e avaliaram se essa terapia é segura para pacientes asmáticos moderados e graves. Houve a necessidade de interromper o estudo devido aos efeitos adversos e os resultados prévios mostraram poucos benefícios com essa terapia. Os autores concluíram que a utilização dessa terapia para grupo de asmáticos de alta reversibilidade ainda é incerto, sendo necessário mais estudos a fim de entender os mecanismo envolvidos nessa população (www.clinicaltrials.gov NCT01199289) (Papp *et al.*, 2012; Buss *et al.*, 2013; Nirula *et al.*, 2016).

Nota-se que a influência da IL-17 sobre aspectos das vias sinalizadoras, estresse oxidativo, remodelamento e modulação de citocinas inflamatórias no parênquima pulmonar ainda não foram estudados em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbado. Portanto, os conhecimentos dos mecanismos envolvidos nesses processos podem fornecer oportunidades de controle da doença.

2 Justificativas do estudo

Diante destas informações anteriormente apresentadas sobre o papel do perfil Th17 em pacientes asmáticos, mostramos a relevância de buscar e avaliar novas opções terapêuticas que possam contribuir para o maior controle dos asmáticos graves, incluindo as situações associadas a exacerbações por infecção. Mostramos também a importância do parênquima pulmonar na asma, considerado como um desafio terapêutico aos pesquisadores a fim de desenvolver novas tecnologias e drogas que permitam uma melhor oferta de agentes antiinflamatórios à porção distal do pulmão e a participação nos processos fisiopatológicos da asma.

Contudo, nota-se que há alguns trabalhos sugerindo a contribuição da IL-17 na hiperresponsividade e modulação do processo inflamatório em modelos experimentais. No entanto, esses e outros aspectos como por exemplo: vias de sinalização NF-kb e Rho quinase, estresse oxidativo e modulação do processo de remodelamento ainda não foram elucidados em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica associado ao LPS. Nossa intenção foi utilizar essa terapêutica anti-IL-17 em modelo de inflamação alérgica crônica incluindo também um grupo com exacerbação por LPS.

2

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com anticorpo neutralizador anti-IL-17 nos septos alveolares em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbada por LPS, avaliando:

- A. O fluido do lavado broncoalveolar (FLBA);
- B. Número de células apresentadoras de antígenos (FOXP3) e células dendríticas
- C. Número de linfócitos CD4+ e CD8+;
- D. A expressão celular de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-6), anti-inflamatórias (IL-10) e linfocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17) e quimiocina (TARC);
- E. Quantificação de IL-6 por RT-PCR;
- F. Elementos da matriz extracelular:
 - a. Fração de volume de fibras colágenas (tipo I e III), actina, decorina, biglicano, lumican, fibronectina e integrina;
 - b. Expressão celular de MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 e TGF-beta
- G. Resposta das vias de estresse oxidativo: expressão celular de INOS e fração de volume isoprostanos PGF-2 α ;
- H. Expressão celular de NF-kB,
- I. Expressão celular das proteínas Rho quinase 1 e 2;

J. Edema intersticial

K. Diâmetro Alveolar Médio - (LM)

3

**MATERIAIS E
MÉTODOS**

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo nº 141/16). O protocolo de sensibilização foi repetido duas vezes, utilizando um total de 60 camundongos machos BALB/c provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo National Institute of Health (NIH publication 85-23, revisado em 1985). Em média, o peso corporal dos animais foi de aproximadamente 20-25g no início do protocolo de sensibilização. Não houve perdas de animais nos protocolos utilizados.

4.2 Grupos experimentais

O protocolo experimental incluiu cinco grupos (n = 6 para cada grupo), sendo que o mesmo foi repetido duas vezes (**Figura 9**):

Modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica:

Grupo SAL: Injeção intraperitoneal (i.p) de soro fisiológico estéril (SF) e inalações com SFE (n=6);

Grupo OVA: Sensibilizado (i.p) com OVA e desafiado com inalações com solução de ovoalbumina (OVA) (n=6);

Grupo OVA + anti-IL-17: Sensibilizado (i.p) com OVA, desafiado com inalações de solução com OVA e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17 (n=6);

Modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbado

Grupo OVA + LPS: Sensibilizado com OVA (i.p), desafiado com inalações com solução de OVA e instilação intratraqueal de LPS (n=6);

Grupo OVA + LPS + anti-IL-17: Sensibilizado com OVA (i.p), desafiado com inalações com solução de OVA, instilação intratraqueal de LPS e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17 (n=6).

Figura 9 Esquema mostrando os grupos experimentais (i.p: injeção intraperitoneal; SF: solução salina estéril; OVA: ovoalbumina e LPS: lipopolissacarídeo)

4.3 Protocolo de sensibilização

Para produzir o modelo de inflamação pulmonar, um antígeno foi injetado via intraperitoneal (i.p) para induzir uma 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 duração de 29 dias. Os camundongos receberam solução de 50 µg de ovoalbumina (*Sigma - Aldrich*) e 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (*Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil*) em um volume total de 0,2 ml por via intraperitoneal (i.p.) nos dias 1 e 14. Nos dias 22, 24, 26 e 28 os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/ml (1%). O tempo em que os animais ficaram em contato com o aerossol foi de 30 minutos (**Figura 10**). Ao mesmo tempo, o Grupo Controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alumen) (6 mg) por via intraperitoneal (i.p.) e nos dias 22, 24, 26 e 28 foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos. Os estudos histopatológicos foram realizados vinte e quatro horas (24 horas) após o último desafio antigênico ou inalação com salina, ou seja, no dia 29 para os animais que receberam a última sensibilização no dia 28 (Arantes-Costa *et al.*, 2008).

4.4 Administração de LPS

A administração LPS foi baseada no protocolo de Starkhammar et al. (2012) que utilizou uma dose baixa de LPS, o que resultou em hiperresponsividade e recrutamento de neutrofílico. O tratamento foi realizado com 20 µl de PBS + 0,1 mg/ml convertido em kg equivale (3 mg/kg) de *Escherichia coli* 0127: (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) vinte e quatro horas após o último desafio antigênico no dia 29 (**Figura 10**). Os animais dos grupos OVA-LPS e OVA-LPS anti-IL-17 foram anestesiados por inalação de isoflurano e receberam LPS por via intratraqueal. Não houve perdas de animais com a utilização dessa dose de LPS.

Figura 10 - Cronograma do protocolo de sensibilização, desafio e tratamento - Nos dias 1 e 14, os grupos OVA, OVA-LPS, OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 foram sensibilizados com OVA (i.p) e o grupo controle SAL recebeu solução salina (i.p). Nos dias 22, 24, 26 e 28, uma hora antes do desafio, os grupos de tratamento receberam anti-IL-17 (i.p) e vinte e quatro horas após do final do protocolo, os grupos OVA-LPS e OVA-LPS anti-IL-17 receberam LPS intratraqueal.

4.5 Tratamento com anticorpo neutralizador anti-IL-17

O anticorpo neutralizador anti-IL-17A (clone 50104) (R e D Systems, Abingdon, Reino Unido) foi administrado por injeção intraperitoneal 1 hora antes de cada administração de aerossol de ovoalbumina nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo de inflamação alérgica crônica e 1 hora antes da administração de LPS, com uma dose de 7,5 µg / aplicação, com base no protocolo Barlow (2011).

Ressaltamos que no estudo piloto realizamos um grupo controle-tratamento (SAL-anti-IL-17) que recebeu o tratamento com anti-IL-17 nos dias 22, 24, 26 e 28. Não houve diferença entre o grupo controle (SAL) e o grupo controle-tratamento SAL anti-IL-17. Sendo assim utilizamos como controle o grupo SAL.

4.6 Análise do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)

Os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg / kg ip) 24 horas após o final do protocolo. A parede torácica anterior foi aberta, os animais foram exsanguinados através da secção da aorta abdominal e o FLBA foi coletado. Foi instilado 0,5mL de soro fisiológico, por 3 vezes consecutivas, com uma seringa, através da cânula de traqueostomia e a cada 0,5mL instilado, foi recuperado o volume. A amostra de lavado broncoalveolar foi centrifugada a 790xgravidade, por 10 minutos, a 5°C, e a média de recuperação foi de 80%.

O botão celular foi ressuspendido em 300µL de salina. Em seguida, agitado no Vórtex, retirado deste material 100µL para preparo da lâmina, para contagem diferencial. O restante do fluído de lavado broncoalveolar foi centrifugado no Cytospin por 6 minutos a 450 rpm em seguida a lâmina foi corada com *Diff Quick*. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o hemocitômetro de Neubauer (400x). A diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x).

4.7 Coloração imunohistoquímica

Imediatamente após a coleta do FLBA, os pulmões foram retirados e fragmentos de tecido pulmonar foram fixados em 10% de formalina e incorporados em parafina. As secções de cinco micrómetros de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina para posterior análise. O material foi submetido a técnicas histológicas padrão como descrito a seguir. As fatias foram desparafinadas e reidratadas para imunohistoquímica, tratadas com Proteinase K durante 20 min a 37°C, seguidas de 20 min a temperatura ambiente e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado por incubação com 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10V (3 x 10 min) e as secções de lâminas de tecido experimentais e de controle (positivas e negativas) foram incubadas durante a noite com os anticorpos indicados (**Figura 11 e 12**). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com um anticorpo secundário usando ABCKit por Vectastain (Vector Elite-PK-6105 anti-cabra), PK-6101 (anti-coelho) e PK-6102 (anti-camundongo).

Marcadores	Diluição	Anticorpo primário	Especificação
IL-2	1:250	Anti-coelho	SC-7896 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-4	1:150	Anti-cabra	SC-1260 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-5	1:600	Anti-coelho	SC-7887 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-6	1:600	Anti-cabra	SC-1265 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-13	1:500	Anti-cabra	SC-1776 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-10	1:50	Anti-camundongo	SC-73309 Camundongo Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-17	1:800	Anti-camundongo	SC-73309 Camundongo Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
CD4	1:600	Anti-camundongo	SC-13573 Camundongo Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
CD8	1:600	Anti-camundongo	YTS- 169AG Camundongo Monoclonal; Thermo Fis. Sci, CA, USA
FOXP3	1:1200	Anti-camundongo	SC-53876 Camundongo Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Células dendrítica**	1:300	Anti-coelho	SC-87673 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
TARC	1:400	Anti-cabra	SC-12271 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
TNF- α	1:100	Anti-camundongo	SC-52746 Camundongo Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Lumicam	1:100	Anti-coelho	AB-168348 Coelho Monoclonal; Abcam Biotech. Life Sci, MA, EUA

Figura 11 - Tipos de anticorpos e diluições utilizadas no estudo ** Este anticorpo monoclonal é relacionado DC-STAMP que representa uma proteína abrangente de múltiplas membranas expressa preferencialmente para células dendríticas. DC-STAMP está presente no retículo endoplasmático de células dendríticas imaturas e pode translocar para o compartimento golgi durante a maturação.

Para a visualização de células positivas, as lâminas foram lavadas em PBS e as proteínas foram visualizadas utilizando cromossoma 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Logo após, foram contrastadas com a hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e montadas usando a resina de microscopia Entellan (Merck) (Possa et al., 2012). A análise foi realizada utilizando a técnica morfométrica descrita a seguir.

Marcadores	Diluição	Anticorpo primário	Especificação
8-iso-PGF2 α	1:1500	Anti-cabra	IS-20 Cabra Polyclonal; Oxford Biomed. Resear, MI, USA
NF- κ B	1:150	Anti-coelho	SC-109 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
ROCK2	1:50	Anti-cabra	SC-6055 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
ROCK1	1:50	Anti-cabra	SC-1851 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
iNOS	1:1600	Anti-camundongo	N-32020 Camundongo Monoclonal; BD transduction Lab. CA, USA
TGF- β	1:600	Anti-coelho	SC-146 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Decorina	1:600	Anti-cabra	SC-22613 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Actina	1:600	Anti-camundongo	SC-22613 Camundongo Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Fibronectina	1:600	Anti-cabra	SC-22613 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Biglicano	1:1200	Anti-cabra	SC-27936 Cabra Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
MMP-9	1:500	Anti-coelho	SC-6840 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
MMP-12	1:400	Anti-coelho	SC-30072 Coelho Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
TIMP-1	1:100	Anti-coelho	LS-C299465 Coelho Polyclonal; LifeSpan BioScien, Inc, WA, USA
Fibra colágena I	1:300	Anti-coelho	AB-34710 Coelho Polyclonal; Abcam Biotech. Life Sci, MA, EUA
Fibra Colágena III	1:600	Anti-coelho	AB-7778 Coelho Polyclonal; Abcam Biotech. Life Sci, MA, EUA

Figura 12 - Tipos de anticorpos e diluições utilizadas no estudo

4.8 Avaliação do diâmetro alveolar médio (LM)

O LM foi medido usando um microscópio (E200MV, Nikon Corporation, Tóquio, Japão) com uma ampliação de 400x e um retículo com uma área conhecida (50 retas e 100 pontos) para calcular quantas vezes as linhas reticulares interceptaram as paredes alveolares. A área inicial das paredes alveolares foi determinada, excluindo as vias aéreas. Para cada animal, 20 campos de parênquima pulmonar foram analisados aleatoriamente. Assim, o diâmetro alveolar médio foi calculado de acordo com comprimento do parênquima distal com o número de interseções entre as linhas e as paredes alveolares. Todos os valores de LM foram expressos em micrômetros (Margraf

et al 1991). Utilizamos esse método de análise para excluir a possibilidade de lesão pulmonar aguda (LPA) na dose de LPS usada no presente estudo.

4.9 Estudos Morfométricos

A técnica de contagem de pontos foi empregada por meio de um retículo de uma área conhecida (50 linhas e 100 pontos) acoplado ao microscópio (E200MV, Nikon Corporation, Tóquio, Japão). Foram contados dez campos aleatórios por animal, com uma ampliação de 1000x, e o número de células positivas foi estabelecido com base no número de pontos que coincidiram com as células positivas nas paredes alveolares dentro do retículo dividido pelo número de pontos coincidentes com as paredes alveolares. A área total do retículo nesse aumento 1000x é de $10^4 \mu\text{m}^2$. A análise foi realizada com uma ampliação de x 1000 (**Figura 13**) (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008).

A densidade óptica foi utilizada para avaliar as frações de volume das fibras de colágeno tipo I e III, actina, decorina, lumican, biglican, fibronectina e isoprostano PGF2 α . As imagens foram capturadas usando um microscópio e uma câmara digital Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram adquiridas e processadas usando o software Optimas v.4.10. Analisamos dez campos por lâmina e uma lâmina por animal. As imagens foram analisadas usando o software *Image-Proplus 4.5* (NIH, Maryland, EUA). Este software permitiu a determinação de um limiar dos tons de cor. As aéreas positivas foram quantificadas dentro da área total previamente determinada. As

frações de volume das áreas positivas foram expressas como porcentagens da área total (Righetti et al., 2014).

Figura 13 Posicionamento do retículo nos septos alveolares para realização da técnica de contagem de pontos.

4.1.0 Avaliação do edema dos septos alveolares

Utilizando um microscópio de luz (Leica DFC 420 Leica microsystems, Wetzlar, Alemanha), oito campos de visão não sobrepostos foram visualizados em incrementos de $\times 100$, $\times 200$ e $\times 400$. Utilizamos um sistema ponderado de pontuação para quantificar o edema intersticial. Resultados de 0 a 4 foram utilizados para representar a gravidade do edema intersticial, com 0 representando nenhum efeito e 4 representando a gravidade máxima. Além disso, o grau de cada pontuação quantificada por campo de visão foi estabelecido em uma escala de 0 a 4, com 0 representando nenhuma medida visível e 4 representando envolvimento completo. Um avaliador desconhecido para todas as condições de tratamento animal, realizou todas as análises. O produto da gravidade e a extensão de cada característica, variando de 0 a 16, foram utilizados para calcular as pontuações globais (Kiss *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017).

4.1.1 Avaliação de expressão gênica de IL-6 por RT-PCR

Para a extração de RNA das amostras foi utilizado o reagente Trizol (*Invitrogen Life Technologies*) e kit de extração (Qiagen, RNeasy Mini Kit 250) para extração em coluna, como descrito a seguir. Aos tubos contendo as amostras de pulmão, foram adicionadas 400µL de Trizol, e armazenados em freezer -80°C. No dia da extração, estas foram homogeneizadas (Vórtex, 15 segundos), seguido da adição de 200µL de clorofórmio. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação foi possível observar 3 diferentes fases: a fase aquosa onde estava o RNA de interesse, a interface que continha proteínas e DNA e por último a fase com o clorofórmio e restos de tecido. A fase aquosa que continha o RNA foi transferida para um novo tubo e a ela foi adicionado 500 µL de isopropanol e incubado por 10 minutos após agitação rigorosa, centrifugado (10 min – 4 °C., 12000g) e retirado e descartado seu sobrenadante e o *pellet* resuspendido com água Milli que (30 µL). A quantificação do RNA total foi determinada por um nanoespectrofotometro de comprimento de onda (260/280 nm) onde o comprimento de 260 nm refere-se à quantidade de ácido nucleico e o 280 nm refere-se à quantidade de proteína. A relação entre essas absorbâncias foi considerada boa quando estas se encontravam dentro dos valores 1,8 a 2,0 (Pinheiro *et al.*, 2015).

A expressão gênica foi avaliada em tempo real qRT-PCR usando o Rotor Gene (Qiagen, Roermond, Holanda) e SYBR Green como corante

fluorescente (Qiagen) com GAPDH como um gene constitutivo. As condições da reação foram: 95°C por 5 minutos, então 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos. Os produtos do PCR foram então submetidos a corrida em um gel de agarose para confirmar o tamanho do fragmento e a especificidade da amplificação. Os primers usados e a temperatura de recozimento foram para o GAPDH (5'-3' sense: CCACCACCCTGTTGCTGTAG; 5'-3' antisense: CTTGGGCTACACTGAGGACC; 60°C; NM_008084) e IL-6R (5'-3' sense: TTCTCGGGAAATCGTGGA; 5'-3' antisense: TCAGAATTGCCATTGCACAAC; 60 °C; NM_001314054). Os resultados foram obtidos como número de ciclo em que as parcelas de PCR logarítmicas cruzam uma linha de limiar calculada e utilizada para determinar os valores de ΔCt [$\Delta Ct = (Ct \text{ do gene alvo}) - (Ct \text{ do gene de limpeza})$]. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias usando a transformação: $\text{Expression} = 1000 \times (2^{-\Delta Ct})$ unidades arbitrárias.

4.1.2 Análise estatística

Todos os dados foram representados como médias $\pm$ erros padrão (S.E), e os gráficos são apresentados em formatos de barras. A análise unidireccional de variância (ANOVA) seguida do método *Holm-Sidak* para comparações múltiplas foi utilizada para determinar a diferença entre os grupos com significância estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *SigmaPlot 11.0* (Systat Software, SPSS Inc., EUA). Um valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4

RESULTADOS

RESULTADOS

5.1 Diâmetro alveolar médio (LM)

Os valores do diâmetro alveolar médio dos grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas. Abaixo seguem os valores absolutos dos grupos: SAL ($42,23 \pm 0,46 \mu\text{m}$), OVA ($40,82 \pm 1,55 \mu\text{m}$), OVA anti-IL-17 ($41,93 \pm 0,60 \mu\text{m}$), OVA-LPS ($44,40 \pm 0,58 \mu\text{m}$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($42,29 \pm 0,51 \mu\text{m}$).

5.2 Edema intersticial

A quantificação do edema intersticial está apresentada na **Figura 14**. Houve aumento no edema intersticial nos grupos OVA ($4,32 \pm 0,38$) e OVA-LPS ($5,61 \pm 0,41$) em comparação ao grupo controle SAL ($1,11 \pm 0,25$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($5,61 \pm 0,41$) houve um aumento quando comparado com o grupo OVA ($4,32 \pm 0,38$), $p < 0,05$. O tratamento com anti-IL-17 reduziu o edema intersticial nos grupos OVA anti-IL-17 ($1,17 \pm 0,10$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($1,80 \pm 0,38$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos (OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17) em comparação com o grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 14 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o edema intersticial * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.3 Efeitos do anti-IL-17 no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA)

5.3.1 Células totais

A contagem total de células e macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar está mostrada na **Figura 15**, foi expressa em 10^4 células/ml. A avaliação de células totais mostrou um aumento nos grupos OVA ($2,72 \pm 0,26 \cdot 10^4$ células/ml) e OVA-LPS ($4,02 \pm 0,21 \cdot 10^4$ células/ml) em comparação com o grupo SAL ($0,57 \pm 0,06 \cdot 10^4$ células/ml), $p < 0,05$. O grupo OVA-LPS ($4,02 \pm 0,21 \cdot 10^4$ células/ml) mostrou uma potencialização quando comparado com grupo OVA

($2,72 \pm 0,26 \cdot 10^4$ células/ml), $p < 0,05$. Os animais dos grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 apresentaram atenuação nos números de células totais em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 em comparação com grupo SAL, respectivamente ($p < 0,05$).

5.3.2 Macrófagos

A contagem de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar está apresentada na **Figura 15** e foi expressa em 10^4 células/ml. A avaliação de macrófagos mostrou um aumento nos grupos OVA ($1,36 \pm 0,33 \cdot 10^4$ células/ml) e OVA-LPS ($1,19 \pm 0,22 \cdot 10^4$ células/ml) em comparação com o grupo SAL ($0,04 \pm 0,00 \cdot 10^4$ células/ml), $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos (OVA e OVA-LPS). Os animais tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-17 nos grupos OVA anti-IL-17 ($0,07 \pm 0,01 \cdot 10^4$ células/ml) e OVA-LPS anti-IL-17 ($0,44 \pm 0,36 \cdot 10^4$ células/ml) apresentaram atenuação apenas no grupo OVA anti-IL-17 quando comparado aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). O grupo tratamento OVA-LPS anti-IL-17 apresentou diferença quando comprado ao grupo SAL, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 15 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células totais e macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.3.3 Neutrófilos

A contagens de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar está apresentada na **Figura 16** e foi expresso em 10^4 células/ml. A avaliação de neutrófilos mostrou um aumento nos grupos OVA ($0,15 \pm 0,12 \times 10^4$ células/ml) e OVA-LPS ($1,16 \pm 0,2 \times 10^4$ células/ml) em comparação com o grupo SAL ($0,00 \pm 0,0 \times 10^4$ células/ml), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($1,16 \pm 0,2 \times 10^4$ células/ml) houve uma potencialização da resposta comparado com grupo OVA ($0,15 \pm 0,12 \times 10^4$ células/ml), $p < 0,05$. Nos grupos OVA anti-IL-17 ($0,03 \pm 0,0 \times 10^4$ células/ml) e OVA-LPS anti-IL-17 ($0,02 \pm 0,0 \times 10^4$ células/ml) houve atenuação no número de neutrófilos em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$).

5.3.4 Eosinófilos

A contagem de eosinófilos no fluido do lavado broncoalveolar está apresentada na **Figura 16** foi expresso em 10^4 células/ml. A avaliação de eosinófilos mostrou um aumento nos grupos OVA ($1,14 \pm 0,9 \times 10^4$ células/ml) e OVA-LPS ($1,15 \pm 0,6 \times 10^4$ células/ml) em comparação com o grupo SAL ($0,00 \pm 0,0$), $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos OVA e OVA-LPS. O tratamento com anti-IL-17 nos grupos OVA anti-IL-17 ($0,04 \pm 0,03 \times 10^4$ células/ml) e OVA-LPS anti-IL-17 ($0,97 \pm 0,6 \times 10^4$ células/ml) resultou em atenuação no número de eosinófilos em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS. Houve diferença no grupo OVA-LPS anti-IL-17 comprado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 16 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de neutrófilos e eosinófilos no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.3.5 Linfócitos

A contagem linfócitos no fluido do lavado broncoalveolar está apresentado na **Figura 17** e foi expresso em 10^4 células/ml. Não houve diferenças entre os grupos.

Figura 17 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número linfócitos no fluido do lavado broncoalveolar (FLBA).

5.4 Efeito do anti-IL-17 na expressão gênica e na expressão celular de IL-6

Comparamos os resultados da análise de expressão gênica de IL-6 por RT-PCR com expressão celular desta citocina avaliada por análise morfolométrica após coloração imunohistoquímica. O número de células positivas e a expressão gênica da IL-6 nos septos alveolares estão apresentados na **Figura 18**. Houve um aumento no número de células positivas nos septos alveolares nos grupos OVA ($3,97 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($8,91 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com o grupo SAL ($0,91 \pm 0,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O grupo OVA-LPS ($8,91 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) mostrou um aumento em

relação ao grupo OVA ($3,97 \pm 0,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti-IL-17 atenuou a expressão de IL-6 nos grupos OVA anti-IL-17 ($1,33 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($2,15 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Houve diferença entre o grupo tratamento OVA-LPS anti-IL-17 comparado com grupo SAL. Apenas uma dose do anti-IL-17 não foi capaz de retornar ao basal as células positivas do grupo OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL, respectivamente $p < 0,05$. Porém, nos demais grupos a avaliação da expressão gênica por PCR mostrou padrões de resposta semelhante em comparação com a análise morfométrica, como mostrado na **Figura 18**. Considerando esses resultados, decidimos avaliar os demais marcadores inflamatórios, de remodelamento de estresse oxidativo adicionais usando análise morfométrica após estudos de imunohistoquímica.

Figura 18 - Efeitos de anti-IL-17 na expressão do gênica e células positivas para IL-6. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias e células positivas $10^4 \mu\text{m}^2$. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.5 Efeitos do tratamento com anti-IL-17 na inflamação

5.5.1 Número de células TARC positivas

O número de células positivas para TARC nos septos alveolares está apresentado na **Figura 19**. Houve aumento no número de células positivas para TARC nos animais expostos à ovoalbumina e/ou LPS e não tratados com anti-IL-17, OVA ($4,32 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($5,61 \pm 0,41$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL $1,11 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O grupo OVA-LPS ($5,61 \pm 0,41$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) mostrou uma potencialização dessa resposta em comparação com o grupo OVA ($4,32 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti-IL-17 reduziu o número de células positivas nos grupos OVA anti-IL-17 ($1,17 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($1,80 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Houve diferença entre o grupo OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 19 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células positivas para TARC nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.5.2 Número de células CD4+

As células positivas para CD4 nos septos alveolares em todos os grupos experimentais foram representadas na **Figura 20**. Houve aumento no número de células positivas para CD4 dos animais do grupo OVA ($4,82 \pm 0,51$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($6,59 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,87 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($6,59 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior comparativamente ao grupo OVA ($4,82 \pm 0,51$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células positivas foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $1,84 \pm 0,32$ e OVA-LPS anti-IL-17: $2,40 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$).

5.5.3 Número de células CD8+

Foi observado um aumento do número de células positivas para CD8 nos septos alveolares entre os animais expostos às inalações de ovoalbumina e/ou LPS não tratados (OVA: $2,96 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $5,37 \pm 0,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos animais do grupo controles (SAL: $0,36 \pm 0,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve uma resposta potencializada no grupo OVA-LPS ($5,37 \pm 0,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado com grupo OVA ($2,96 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Os animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $0,67 \pm 0,09$ e OVA-LPS anti-IL-17: $1,94 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentam valores menores quando comparado aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre o grupo OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$, **Figura 20**).

Figura 20 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células positivas para CD4+ e CD8+ nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.5.4 Número de células IL-2 positivas

Na **Figura 21** podemos observar um aumento no número de células positivas para IL-2 nos septos alveolares. Esse aumento ocorreu nos grupos sensibilizados e que receberam LPS e não foram tratados (OVA: $3,21 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $5,30 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $0,92 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O grupo OVA-LPS ($5,30 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) mostrou uma potencialização dessa resposta em comparação com o grupo OVA ($3,21 \pm 0,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti-IL-17 reduziu o número de células positivas nos grupos OVA anti-IL-17 ($1,69 \pm 0,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($1,94 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença nos grupos tratamento entre os grupos OVA anti-17 e OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

5.5.5 Número de células IL-4 positivas

O número células positivas para IL-4 nos septos alveolares em todos os grupos experimentais está representado na **Figura 21**. Houve aumento nos grupos (OVA: $2,48 \pm 0,39$ e OVA-LPS: $6,24 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $0,27 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O grupo OVA-LPS ($6,24 \pm 0,64$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo OVA ($2,48 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células IL-4 positivas foi

menor no grupo tratamento OVA anti-IL-17 ($0,27 \pm 0,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($2,69 \pm 0,33$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). No grupo OVA-LPS anti-IL-17 houve diferença comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 22 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células positivas para IL-2 e IL-4 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA

5.5.6 Número de células IL-5 positivas

Na **Figura 22** podemos observar um aumento do número de células IL-5 positivas nos septos alveolares nos animais expostos às inalações de ovoalbumina exacerbados ou não pelo LPS, não tratados (OVA: $5,20 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $7,36 \pm 0,56$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos animais do grupo controle (SAL: $0,94 \pm 0,19$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve uma resposta potencializada no grupo OVA-LPS ($7,36 \pm 0,56$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado grupo OVA ($5,20 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Os

animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $1,74 \pm 0,13$ e OVA-LPS anti-IL-17: $2,06 \pm 0,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentam valores menores de células positivas quando comparados aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Os grupos tratamento OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-17 apresentaram diferenças comparado ao grupo SAL $p < 0,05$.

5.5.7 Número de células IL-10 positivas

A resposta anti-inflamatória da IL-10 nos septos alveolares está apresentada na **Figura 22**. Houve aumento no número de células IL-10 positivas nos animais do grupo OVA ($4,10 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($6,22 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $0,54 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($6,22 \pm 0,30$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($4,10 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células IL-10 positivas foi menor no grupo tratamento OVA anti-IL-17 ($0,78 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($1,72 \pm 0,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença no grupo OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupos SAL ($p < 0,05$).

Figura 22 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células positivas para IL-10 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.5.8 Número de células IL-13 positivas

Conforme podemos observar na **Figura 23** um aumento no número de células IL-13 positivas nos septos alveolares dos animais sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e/ou exposto ao LPS (OVA: $6,01 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $9,85 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina SAL ($1,25 \pm 0,14$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($9,85 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($6,01 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células IL-13 positivas foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $3,08 \pm 0,47$ e OVA-LPS anti-IL-17: $2,66 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Os animais dos grupos tratamento (OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL17), apresentaram diferenças comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

4.5.9 Número de células IL-17 positivas

Foi observado na **Figura 23** um aumento do número de células IL-17 positivas nos septos alveolares entre os animais expostos às inalações de ovoalbumina e/ou LPS e não tratados (OVA: $10,42 \pm 0,73$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $11,95 \pm 0,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos animais do grupo controle (SAL: $2,14 \pm 0,42$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Não houve diferenças entre o grupo OVA-LPS e OVA. Os animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $5,77 \pm 0,61$ e OVA-LPS anti-IL-17: $5,71 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram uma atenuação das respostas quando comparados aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos tratamento (OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL17) comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 23 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células IL-13 e IL-17 positivas nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.5.2.1 Número de células TNF-alfa positivas

Na **Figura 24** podemos observar um aumento no número de células positivas para TNF-alfa nos septos alveolares dos animais dos grupos sensibilizados e/ou que receberam LPS e não foram tratados (OVA: $5,43 \pm 0,54$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $3,15 \pm 0,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,18 \pm 0,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve uma atenuação das respostas com o uso do anti-IL-17 nos grupos OVA anti-IL-17 ($1,50 \pm 0,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($1,65 \pm 0,49$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença nos tratamento com anti-IL-17 nos grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 comprado ao grupo SAL ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-LPS e OVA.

Figura 24 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células TNF-alfa positivas nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS.

5.6 Efeitos do anti-IL-17 no número de células T Reguladoras (Treg) e em células apresentadoras de antígeno

5.6.1 Número de células FOXP3

Houve um aumento de células positivas para FOXP3 nos septos alveolares, conforme apresentado na **Figura 25** nos grupos OVA ($8,78 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($11,30 \pm 1,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo controle exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,37 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($11,30 \pm 1,32$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($8,78 \pm 0,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve uma atenuação de resposta com o uso do anti-IL-17 nos grupos OVA anti-IL-17 ($5,77 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($5,71 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-17 comparado ao grupo SAL $p < 0,05$. Não houve diferenças entre os grupos OVA-LPS e OVA.

5.6.2 Número de células dendríticas

Os resultados do número de células dendríticas nos septos alveolares podem ser observados na **Figura 25**. Houve aumento nos animais do grupo OVA e OVA-LPS, (OVA: $3,42 \pm 0,43$ e OVA-LPS $7,23 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina SAL ($0,44 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($7,23 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$)

houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($3,42 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células dendríticas foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $1,06 \pm 0,25$ e OVA-LPS anti-IL-17: $2,00 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 25 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de FOXP3 e células dendríticas positivas nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.7 Efeitos do anti-IL-17 no remodelamento da matriz extracelular

5.7.1 Número de células positivas para MMP-9

As células positivas para MMP-9 nos septos alveolares em todos os grupos experimentais podem ser observadas na **Figura 26**. Houve aumento nos animais do grupo OVA e OVA-LPS (OVA: $8,11 \pm 0,47$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($16,50 \pm 0,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação

com solução salina (SAL: $2,70 \pm 0,46$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($16,50 \pm 0,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($8,11 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti-IL-17 atenuou o número de células positivas nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $2,57 \pm 0,36$ e OVA-LPS anti-IL-17: $9,75 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre o grupo OVA-LPS anti-IL17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

5.7.2 Número de células positivas para MMP-12

Na **Figura 26** podemos observar um aumento no número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares nos grupos sensibilizados e que receberam ou não LPS e não foram tratados (OVA: $7,51 \pm 0,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $11,00 \pm 1,96$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $0,32 \pm 0,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($11,00 \pm 1,96$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve potencialização de resposta quando comparado ao grupo OVA ($7,51 \pm 0,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve atenuação com o uso do anti-IL-17 nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $1,36 \pm 0,26$ e OVA-LPS anti-IL-17: $1,62 \pm 0,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS. Houve diferenças entre os grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 26 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células positivas para MMP-9 e MMP-12 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.7.3 Número de células TIMP-1 positivas

Os resultados do número de células TIMP-1 positivas nos septos alveolares podem ser observadas na **Figura 27**. Houve aumento nos animais dos grupos OVA ($8,29 \pm 0,85$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($9,96 \pm 0,95$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo SAL ($0,44 \pm 0,10$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células TIMP-1 positivas foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $2,72 \pm 0,48$ e OVA-LPS anti-IL-17: $3,95 \pm 0,56$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos tratamento (OVA anti-IL17 e OVA-LPS anti-IL17) comparado com grupo SAL ($p < 0,05$). Não houve diferenças nos grupos OVA-LPS e OVA.

5.7.4 Número de células TGF- β positivas

Foi observado um aumento do número de células TGF- β positivas nos septos alveolares entre os animais expostos às inalações de ovoalbumina e/ou LPS e não tratados (OVA: $31,60 \pm 2,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $42,06 \pm 1,91$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos animais do grupo controle (SAL: $1,65 \pm 0,23$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve aumento no número de células TGF- β positivas no grupo OVA-LPS ($42,06 \pm 1,91$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), quando comparado ao grupo OVA ($31,60 \pm 2,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Nos animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $19,84 \pm 1,53$ e OVA-LPS anti-IL-17: $8,35 \pm 0,75$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma atenuação das respostas quando comparado aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos tratamento (OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17) comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$) (**Figura 27**).

Figura 27 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para expressão de células positivas para TIMP-1 e TGF-beta nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.7.5 Fração de volume de fibras colágenas tipo I

Conforme podemos observar na **figura 28** houve um aumento na fração de volume de fibras colágenas tipo I nos septos alveolares dos animais dos grupos OVA ($22,25 \pm 2,16$ %) e OVA-LPS ($25,19 \pm 1,48$ %) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina SAL ($12,16 \pm 0,88$ %), $p < 0,05$. Não houve diferença entre os grupos OVA-LPS e OVA. A fração de volume de fibras colágenas tipo I foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $13,58 \pm 1,12$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $20,08 \pm 0,72$ %) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença apenas no grupo OVA-LPS anti-IL17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

5.7.6 Fração de volume de fibras colágenas tipo III

A fração de volume de fibras colágenas tipo III está mostrada na **Figura 28**. Esta fração de fibras colágenas tipo III foi maior nos grupos de animais expostos à ovoalbumina e LPS (OVA: $13,47 \pm 0,62$ % e OVA-LPS ($20,10 \pm 0,80$ %) quando comparados aos camundongos expostos à salina (SAL: $0,89 \pm 0,09$ % $p < 0,05$). Nos animais do grupo OVA-LPS ($20,10 \pm 0,80$ %) apresentaram uma potencialização de resposta quando comparados ao grupo OVA ($13,47 \pm 0,62$ %), $p < 0,05$. A fração de volume de fibras colágenas tipo III foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $8,17 \pm 0,53$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $7,89 \pm 0,71$ %) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos tratamento (OVA anti-IL17 e OVA-LPS anti-IL-17) comparado ao grupo controle (SAL) ($p < 0,05$).

Figura 28 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para fração de volume de fibras colágenas tipo I e III nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.7.7 Fração de volume de decorina

A fração de volume de decorina está mostrada na **Figura 28** e foi maior nos grupos OVA ($52,68 \pm 2,60$ %) e OVA-LPS ($55,66 \pm 2,37$ %) quando comparados aos camundongos expostos à salina (SAL: $1,62 \pm 0,29$ %), $p < 0,05$. Não houve diferenças entre os grupos OVA-LPS e OVA. A fração de volume de decorina foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $2,77 \pm 0,43$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $8,00 \pm 0,92$ %) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$).

5.7.8 Fração de volume de lumican

Foi observado na **Figura 28** um aumento na fração de volume referente a lumican nos septos alveolares entre os animais dos grupos OVA ($27,39 \pm 1,02$ %) e OVA-LPS ($26,57 \pm 0,68$ %) em comparação aos animais do grupo controle SAL ($14,03 \pm 0,18$ %), $p < 0,05$. Não houve diferenças entre os

grupos OVA-LPS e OVA. Nos animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $21,64 \pm 1,47$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $15,33 \pm 0,54$ %) houve uma atenuação na fração de volume de lumicam quando comparados aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 28 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para fração de volume de decorina e lumicam nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.7.9 Fração de volume de actina

A fração de volume de actina está mostrado na **Figura 29**. Houve aumento na fração de volume de actina nos grupos OVA ($28,44 \pm 1,99$ %) e OVA-LPS ($29,90 \pm 1,93$ %) quando comparados ao grupo controle (SAL: $8,05 \pm 1,84$ %), $p < 0,05$. A fração de volume de actina foi menor no grupo tratamento (OVA anti-IL-17: $12,80 \pm 1,29$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $6,9 \pm 1,66$ %) em comparação

com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-LPS e OVA.

5.7.1.1 Fração de volume de biglicano

Conforme podemos observar na **Figura 29** houve um aumento na fração de volume de biglicano nos grupos OVA ($12,47 \pm 0,71$ %) e OVA-LPS ($20,68 \pm 2,83$ %) quando comparados ao grupo controle SAL ($4,13 \pm 0,23$ %), $p < 0,05$. Os animais do grupo OVA-LPS ($20,68 \pm 2,83$ %) apresentaram uma potencialização de resposta quando comparado ao grupo OVA ($12,47 \pm 0,71$ %), $p < 0,05$. Houve uma atenuação com o uso do anti-IL-17 nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $5,39 \pm 1,08$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $5,00 \pm 0,66$ %) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 29 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para fração de volume de actina e biglicano nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.7.1.2 Fração de volume de fibronectina

Notamos também um aumento na fração de volume de fibronectina, conforme mostrado na **Figura 30** nos grupos OVA ($40,27 \pm 1,65$ %) e OVA-LPS ($48,56 \pm 2,03$ %) em comparação aos animais do grupo controle (SAL: $4,60 \pm 0,47$ %), $p < 0,05$. Os animais do grupo OVA-LPS ($48,56 \pm 2,03$ %) apresentaram uma potencialização de resposta quando comparados ao grupo OVA ($40,27 \pm 1,65$ %), $p < 0,05$. Nos animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $11,17 \pm 1,06$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $10,20 \pm 0,78$ %), houve uma atenuação de resposta quando comparados aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos tratamento (OVA anti-IL17 e OVA-LPS anti-IL17) comparado com grupo SAL ($p < 0,05$). ($p < 0,05$).

5.7.1.2 Fração de volume de integrina

Conforme podemos observar na **Figura 30** houve um aumento na fração de volume de integrina nos grupos OVA (%) e OVA-LPS (%) quando comparados ao grupo controle SAL ($\pm$ %), $p < 0,05$. Os animais do grupo OVA-LPS ($\pm$ %) apresentaram uma potencialização de resposta quando comparado ao grupo OVA ($\pm$ %), $p < 0,05$. Houve uma atenuação com o uso do anti-IL-17 nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $\pm$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $\pm$ %) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos tratamento (OVA anti-IL17 e OVA-LPS anti-IL17) comparado com grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 30 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para fração de volume de fibronectina nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.8. Efeitos de anti-IL-17 no estresse oxidativo

5.8.1 Número de células iNOS positivas

Os resultados da avaliação do número de células iNOS positivas nos septos alveolares podem ser observados na **Figura 31**. Houve aumento nos animais dos grupos OVA ($3,87 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($7,92 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo SAL ($1,07 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Houve uma potencialização de resposta no grupo OVA-LPS ($7,92 \pm 0,70$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparado ao grupo OVA ($3,87 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. Os grupos tratamento apresentaram atenuação de resposta (OVA anti-IL-17: $2,16 \pm 0,46$ e OVA-LPS anti-IL-17: $3,29 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre o grupo OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo controle (SAL) ($p < 0,05$).

5.8.2 Fração de volume Isoprostano 8-iso-PGF2 α

Na **Figura 31** nota-se um aumento na fração de volume referente a 8-iso-PGF2 α nos septos alveolares dos grupos OVA ($2,70 \pm 0,55$ %) e OVA-LPS ($4,78 \pm 0,48$ %) em comparação aos animais do grupo controle (SAL: $0,46 \pm 0,09$ %), $p < 0,05$. Os animais do grupo OVA-LPS ($4,78 \pm 0,48$ %) apresentaram uma potencialização da resposta quando comparado ao OVA ($2,70 \pm 0,55$ %), $p < 0,05$. Nos animais que receberam o anticorpo neutralizador anti-IL-17 (OVA anti-IL-17: $0,37 \pm 0,0$ % e OVA-LPS anti-IL-17: $0,22 \pm 0,0$ %) houve uma atenuação de resposta quando comparado aos grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 31 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para células positivas e fração de volume para 8-iso-PGF2 α nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS # $p < 0,05$ comparado ao OVA.

5.9 Efeitos do tratamento com anti-IL-17 nas vias sinalizadoras

5.9.1 Número de células ROCK1 positivas

Os resultados do número de células ROCK-1 positivas nos septos alveolares podem ser observadas na **Figura 32**. Houve aumento nos animais dos grupos OVA ($6,31 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS ($10,85 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $0,70 \pm 0,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($10,85 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($6,31 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O número de células positivas foi menor nos grupos tratamento (OVA anti-IL-17: $1,58 \pm 0,22$ e OVA-LPS anti-IL-17: $3,38 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

5.9.2 Número de células ROCK-2 positivas

As células positivas para ROCK-2 nos septos alveolares em todos os grupos experimentais podem ser observadas na **Figura 32**. Houve aumento nos animais dos grupos OVA e OVA-LPS OVA (OVA: $6,02 \pm 1,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e OVA-LPS: $12,26 \pm 1,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,44 \pm 0,27$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. No grupo OVA-LPS ($12,26 \pm 1,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) houve uma resposta maior quando comparado ao grupo OVA ($6,02 \pm 1,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $p < 0,05$. O tratamento com anti-IL-17 atenuou o número de células positivas nos grupos OVA anti-IL-17 ($3,68 \pm 0,47$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e OVA-LPS anti-IL-17 ($8,31 \pm 0,80$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS,

respectivamente ($p < 0,05$). Houve diferença entre os grupos OVA anti-IL-17 comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 32 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para células positiva ROCK-1 e ROCK-2 nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS.

5.9.3 NF-kB

Na **Figura 32** podemos observar um aumento no número de células positivas para NF-kB nos septos alveolares nos animais dos grupos OVA ($7,11 \pm 0,62$ células/10⁴ μm²) e OVA-LPS ($6,74 \pm 0,56$ células/10⁴ μm²) em comparação ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $0,18 \pm 0,0$ células/10⁴ μm²), $p < 0,05$). Houve uma atenuação com o uso do anti-IL-17 nos grupos tratamento, (OVA anti-IL-17: $0,91 \pm 0,23$ e OVA-LPS anti-IL-17: $1,79 \pm 0,30$ células/10⁴ μm²) em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS, respectivamente ($p < 0,05$). No grupo OVA-LPS anti-IL-17 houve um aumento das células positivas comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA-LPS e OVA.

Figura 32 - Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para células NF-kB positiva nos septos alveolares. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS.

5.1.0.1 Efeitos do tratamento com anti-IL-17 através da análise qualitativa

5.1.0.2 Células positivas para IL-4, IL-13 e IL-17

Fotomicrografias dos septos alveolares identificando células positivas para IL-4, IL-13 e IL-17 **Figura 33**. Os animais sensibilizados com ovoalbumina e que receberam ou não LPS (OVA e OVA-LPS) apresentaram aumento proeminente no número de células positivas em comparação com os animais de

controle (grupo SAL). O tratamento anti-IL-17 no grupo OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 reduziu número de células positivas para esses marcadores.

Figura 33 – Fotomicrografias do processo inflamatório dos septos alveolares. As células IL-4, IL-13 e IL-17 positivas estão identificados pelas setas vermelha. Todas as imagens são apresentadas no aumento 1.000x, escala =10 µm. Os grupos experimentais são representados como: SAL, OVA, OVA anti-IL-17, OVA-LPS e OVA-LPS anti-IL-17.

5.1.0.3 Fração de volume para fibras colagenas I e células positivas para TIMP1

Fotomicrografias dos septos alveolares avaliando o processo de remodelamento da matriz extracelular. A fração de volume para fibras colágenas tipo I e expressão de células positivas para TIMP-1 são apresentados na **Figura 34**. Os animais sensibilizados com ovoalbumina e que receberam ou não LPS (OVA e OVA-LPS) apresentaram aumento na fração de volume e no número de

células positivas para TIMP-1, em comparação com os animais de controle (grupo SAL). O tratamento anti-IL-17 no grupo OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 atenuou essas respostas.

Figura 34 - Fotomicrografias do processo de remodelamento da matriz extracelular nos septos alveolares. As células TIMP-1 e o conteúdo de fibras colagénas estão identificados pelas setas vermelha. Todas as imagens são apresentadas no aumento 1.000 $\times$, escala =10 μ m. Os grupos experimentais são representados como: SAL, OVA, OVA anti-IL-17, OVA-LPS e OVA-LPS anti-IL-17.

5.1.0.4 Células positivas para NF- κ B e fração de volume de isoprostano (8-isoPGF-2- α)

A avaliação qualitativa das vias de sinalização e estresse oxidativo está apresentada na **Figura 35**. Houve um aumento no número de células positivas para NF- κ B e na fração de volume para 8-isoPGF-2- α nos grupos não

tratados OVA e OVA-LPS em comparação com o grupo SAL. O tratamento anti-IL-17 no grupo OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 diminuiu essas respostas.

Figura 35 - Fotomicrografias das vias de sinalização e estresse oxidativo nos septos alveolares. As células NF-κB positivas e o conteúdo de 8-isoPGF-2-α estão identificados pelas setas vermelha. Todas as imagens são apresentadas no aumento 1.000×, escala =10 μm. Os grupos experimentais são representados como: SAL, OVA, OVA anti-IL-17, OVA-LPS e OVA-LPS anti-IL-17.

5.1.0.4 Resultados absolutos

5.1.0.5 Marcadores FLBA e inflamatórios

Tabela 1 – Valores absolutos para marcadores de células do fluido do lavado broncoalveolar (FLBA) e células inflamatórias.

Marcadores - FLBA	SAL	OVA	OVA ANTI-17	OVA-LPS	OVA-LPS-ANTI-17
Total cells (10^4 /Células/mL)	0,57±0,06	2,72±0,26*	1,42±0,22***	4,02±0,21*#	2,67±0,19***
Macrophages (10^4 /Células/mL)	0,04±0,00	1,36±0,33*	0,07±0,01**	1,19±0,22*	0,44±0,36***
Neutrophils (10^4 /Células/mL)	0,00±0,00	0,15±0,12*	0,03±0,00**	1,16±0,20*#	0,02±0,00**
Eosinophils (10^4 /Células/mL)	0,00±0,00	0,84±0,49*	0,04±0,03**	1,15±0,32*	0,97±0,26***
Marcadores Inflamatórios	SAL	OVA	OVA ANTI-17	OVA-LPS	OVA-LPS-ANTI-17
IL-2 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,92±0,08	3,21±0,16*	1,69±0,18***	5,30±0,27*#	1,94±0,10***
IL-4 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,27±0,12	2,48±0,39*	0,27±0,05***	6,24±0,64*#	2,69±0,33***
IL-5 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,94±0,19	5,20±0,49*	1,74±0,13***	7,36±0,56*#	2,06±0,34***
IL-6 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,91±0,11	3,97±0,22*	1,33±0,16**	8,91±0,39*#	2,15±0,14***
IL-10 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,54±0,09	4,10±0,25*	0,78±0,10**	6,22±0,30*#	1,72±0,18**
IL-13 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,25±0,14	6,01±0,52*	3,08±0,47***	9,85±0,75*#	2,66±0,52***
IL-17 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	2,14±0,42	10,42±0,73*	5,77±0,61***	11,95±0,77*	5,71±0,93***
CD4+ (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,87±0,16	4,82±0,51*	1,84±0,32**	6,59±0,64*#	2,40±0,37**
CD8+ (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,36±0,11	2,96±0,38*	0,67±0,09**	5,37±0,65*#	1,94±0,30***
TNF- α (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,18±0,37	5,43±0,54*	1,50±0,34***	3,15±0,62*	1,65±0,49***
TARC (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,11±0,25	4,32±0,38*	1,17±0,10**	5,61±0,41*#	1,80±0,38***

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL. ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p <$

0,05 comparado ao grupo OVA. + $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

5.1.0.6 Marcadores para células apresentadoras de antígenos, T reguladoras e de remodelamento da matriz extracelular.

Tabela 2 – Valores absolutos para marcadores de APC, Treg e remodelamento

Marcadores de células Treg e APC	SAL	OVA	OVA ANTI-17	OVA-LPS	OVA-LPS-ANTI-17
Células Dendríticas (Células positivas/104 μm^2)	0,44 $\pm$ 0,10	3,42 $\pm$ 0,43*	1,06 $\pm$ 0,20***	7,23 $\pm$ 0,93*#	2,00 $\pm$ 0,26***
FOXP3 (Células positivas/104 μm^2)	1,37 $\pm$ 0,29	8,78 $\pm$ 0,74*	5,77 $\pm$ 0,61***	11,30 $\pm$ 1,32*#	5,71 $\pm$ 0,93***
Marcadores Remodelamento	SAL	OVA	OVA ANTI-17	OVA-LPS	OVA-LPS-ANTI-17
MMP-9 (Células positivas/10 ⁴ μm^2)	2,70 $\pm$ 0,46	8,11 $\pm$ 0,47*	2,57 $\pm$ 0,36**	16,50 $\pm$ 0,62*#	9,75 $\pm$ 0,43***
MMP-12 (Células positivas/10 ⁴ μm^2)	0,32 $\pm$ 0,06	7,51 $\pm$ 0,48*	1,36 $\pm$ 0,26***	11,00 $\pm$ 1,96*#	1,62 $\pm$ 0,28***
TIMP-1 (Células positivas/10 ⁴ μm^2)	1,11 $\pm$ 0,18	8,29 $\pm$ 0,85*	2,72 $\pm$ 0,48***	9,96 $\pm$ 0,95*	3,95 $\pm$ 0,56***
TGF-beta (Células positivas/10 ⁴ μm^2)	1,65 $\pm$ 0,23	31,60 $\pm$ 2,22	19,58 $\pm$ 1,53***	42,06 $\pm$ 1,91*#	8,35 $\pm$ 0,75*
Actina (%)	8,05 $\pm$ 1,84	28,44 $\pm$ 1,99*	12,80 $\pm$ 1,29**	29,90 $\pm$ 1,93*	6,9 $\pm$ 1,66**
Biglicano (%)	4,13 $\pm$ 0,23	12,47 $\pm$ 0,71*	5,39 $\pm$ 1,08**	20,68 $\pm$ 2,83*#	5,00 $\pm$ 0,66**
Fibras Colágenas I (%)	12,16 $\pm$ 0,88	22,25 $\pm$ 2,16*	13,58 $\pm$ 1,12**	25,19 $\pm$ 1,48*	20,08 $\pm$ 0,72***
Fibras Colágenas III (%)	0,89 $\pm$ 0,09	13,47 $\pm$ 0,62*	8,17 $\pm$ 0,53***	20,10 $\pm$ 0,80*#	7,89 $\pm$ 0,71***
Decorina (%)	1,62 $\pm$ 0,29	52,68 $\pm$ 2,60*	2,77 $\pm$ 0,43**	55,66 $\pm$ 2,37*	8,00 $\pm$ 0,92**
Integrina (%)	1,77 $\pm$ 0,15	6,45 $\pm$ 0,25*	3,09 $\pm$ 0,27**	7,27 $\pm$ 0,98*	5,30 $\pm$ 0,32**
Lumican (%)	14,03 $\pm$ 0,18	27,39 $\pm$ 1,02*	21,64 $\pm$ 1,47***	26,57 $\pm$ 0,68*	15,33 $\pm$ 0,54**
Fibronectina (%)	4,60 $\pm$ 0,47	40,27 $\pm$ 1,65*	11,17 $\pm$ 1,06***	48,56 $\pm$ 2,03*#	10,20 $\pm$ 0,78***

* p< 0,05 comparado ao grupo SAL. ** p< 0,05 comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # p< 0,05 comparado ao grupo OVA.

5.1.0.7 Marcadores do estresse oxidativo e vias sinalizadoras.

Tabela 3 – Valores absolutos para marcadores de estresse oxidativos e NF-kB, ROCK-1 e ROCK-2

Marcadores Estresse Oxidativo	SAL	OVA	OVA ANTI-17	OVA-LPS	OVA-LPS-ANTI-17
iNOS (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,07±0,22	3,87±0,21*	2,16±0,46**	7,92±0,70*#	3,29±0,38***
8-iso-PGF2 α (%)	0,46±0,09	2,70±0,55*	0,37±0,04**	4,78±0,63*#	0,22±0,03**
Macadores - vias sinalizadoras	SAL	OVA	OVA ANTI-17	OVA-LPS	OVA-LPS-ANTI-17
NFkB (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,18±0,05	7,11±0,62*	0,91±0,23**	6,74±0,56*	1,79±0,30***
ROCK-1 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,70±0,08	6,31±0,36*	1,58±0,22***	10,85±0,39*#	3,38±0,36***
ROCK-2 (Células positivas/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,44±0,27	6,02±1,04*	3,68±0,47***	12,26±1,11*#	8,31±0,80***

* $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL. ** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA e OVA-LPS. # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5.1.0.8 Apresentação em esquema dos resultados.

5.1.0.9 Resultados do grupo OVA comparado ao controle SAL.

Figura 36 – Esquema apresentando os resultados dos marcadores de células positivas e/ou fração de volume do FLBA, inflamação, remodelamento, vias de sinalização e estresse oxidativo. Houve aumento em todos os marcados ($p < 0,05$ comparado ao grupo SAL), exceto linfócitos no FLBA. Setas na vertical significam o aumento das células positivas e/ou fração de volume dos marcadores avaliados e a linha contínua na horizontal significa que não houve diferença

5.1.1.0 Resultados do grupo OVA-LPS comparado ao OVA.

Figura 37 – Esquema apresentando os resultados dos marcadores de células positivas e/ou fração de volume do FLBA, inflamação, remodelamento, APC, Treg, vias de sinalização e estresse oxidativo. Houve uma potencialização nos marcadores de células totais, neutrófilos, TARC, CD4, CD8, células dendrítica, FOXP3, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-6, ROCK-1, ROCK-2, MMP-9, MMP-12, TGF-beta, fibras colágenas tipo III, biglicano, fibronectina e integrina ($p < 0,05$ comparado ao grupo OVA).

5.1.1.0 Resultados dos grupos tratamento (OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17) comparado ao grupo controle (SAL).

Figura 38 – Esquema apresentando os resultados dos marcadores de células positivas e/ou fração de volume do FLBA, inflamação, remodelamento, APC, Treg, vias de sinalização e estresse oxidativo. * p< 0,05 comparado ao grupo SAL. ** Não houve diferença comparado ao grupo SAL.

5

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Avaliamos os efeitos da inibição da IL-17 em modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado por LPS, utilizando um anticorpo monoclonal anti-IL-17. Foram analisadas as respostas relacionadas à infiltração de células inflamatórias, expressão celular de Treg, células apresentadoras de antígeno, citocinas e quimiocinas, estresse oxidativo, remodelamento da matriz extracelular, vias de sinalização e expressão gênica de IL-6.

Foi observada uma atenuação das respostas inflamatórias Th1, Th2 e Th17, células Treg e células apresentadoras de antígeno em ambos os grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17, representado por reduções no número total de células inflamatórias, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no FLBA. No entanto, não houve diferença no número de linfócitos. Consideramos que já era esperado, uma vez que estas células estão principalmente presentes nas paredes das vias aéreas. Vários estudos mostraram um número baixo de linfócitos em comparação com eosinófilos em FLBA em modelos experimentais de asma e em pacientes asmáticos (Tiberio *et al.*, 1997; Seitzman *et al.*, 1998; Murakami *et al.*, 2007). O tratamento com anti-IL foi capaz de atenuar a resposta de macrófagos apenas no grupo OVA anti-IL-17. Hipotetizamos que a diminuição não tenha ocorrido no grupo OVA-LPS anti-IL-17 pela mudança de fenótipo do macrófago, uma vez que o LPS e IL-4 regula a alteração de M1 para M2 perfil mais reparador (Stein *et al.*, 1992; Biswas *et al.*, 2010). O papel da IL-17 e sua interação com macrófagos na asma ainda não está elucidado, se tornando um campo para pesquisas futuras.

O tratamento anti-IL-17 também diminuiu os marcadores de remodelamento da matriz extracelular com redução na fração de volume de actina, biglicano, fibras de colágeno I e III, decorina, lumican e fibronectina, bem como os níveis de expressão celular de MMP-9, MMP-12, TIMP-1 e TGF- β .

Consistentemente, houve uma diminuição no número de células positivas para iNOS e da fração de volume de PGF-2- α (isoprostano) em grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17 e, de forma semelhante, nas vias de sinalização mediadas por Rho quinases 1 e 2 e NF- κ B.

O modelo experimental utilizado aqui foi caracterizado por duas fases distintas. Na primeira etapa, induzimos inflamação alérgica através de exposições repetidas à ovoalbumina. No segundo estágio, nosso objetivo foi estudar um modelo de asma exacerbado, usando uma dose baixa de LPS como descrito anteriormente (Starkhammar *et al.*, 2012). Não consideramos que esta baixa dose de LPS (0,01 mg / ml) pudesse causar lesão pulmonar aguda com base em estudos anteriores em que a lesão pulmonar aguda foi induzido por doses de LPS de cerca de 50 a 100 vezes maiores do que a utilizada no presente estudo (Abdelmageed *et al.*, 2015; Fodor *et al.*, 2016).

Fodor *et al.* (2015) utilizaram doses crescentes de LPS (3, 5, 10 mg / kg) para quantificar a gravidade da lesão frente ao efeito dose-dependente. Os autores concluíram que os achados confirmaram a sepse e o dano da membrana alvéolo-capilar de uma maneira dose-dependente de LPS. No entanto, nesse estudo a menor dose de 3 mg/kg (ajustada para mg por animal) foi 130 vezes maior que a utilizada em nosso protocolo (0,01 mg/ml). Reforçando nossa

hipótese e para descartar a possibilidade de danos alveolares por esta dose baixa de LPS, realizamos a avaliação diâmetro alveolar médio (LM) (Menden *et al.*, 2016). O LM é um índice pela qual avaliamos o diâmetro médio dos espaços alveolares para verificar o nível de destruição alveolar. Observamos que não houve diferenças entre os grupos.

Em estudos anteriores, demonstramos que este modelo experimental de inflamação alérgica induzida por exposições repetidas do antígeno apresentou várias características presentes na fisiopatologia da asma, como a hiperresponsividade, inflamação eosinofílica, aumento das respostas de estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular no parênquima distal (Angeli *et al.*, 2008; Starling *et al.*, 2009; Possa *et al.*, 2012; Aristoteles *et al.*, 2013; Righetti *et al.*, 2014; Sakoda *et al.*, 2016).

Quanto ao aumento das citocinas Th1 / Th2 e Th17 observadas no presente estudo, o aumento dos níveis de células CD4 + e CD8 + ativa respostas imunes em humanos e modelos experimentais de mamíferos. Sabe-se que CD4+ é considerado um dos marcadores para células Th17 (Galli e Tsai, 2008; Newcomb *et al.*, 2009; Taher *et al.*, 2010; Peebles, 2013). Wang *et al.* (2011) demonstraram que as células CD4 + / Th2 induziram inflamação durante a fase crônica da asma e essas células produzem IL-17.

O número de células positivas para IL-4 e IL-13 foi maior que o observado em relação ao número de células positivas para IL-17. Esse aumento pode estar relacionado a um efeito de outra citocina. Aventamos a possibilidade de ser decorrente do aumento de IL-6, já que essa citocina emergiu nos últimos

anos como um regulador das respostas CD4 e pode induzir as respostas Th1 e Th2 (Rincon e Irvin, 2012). Corroborando com essas descobertas, Diehl et al. (2002) mostraram que a IL-6 promove a produção de IL-4 e IL-13 em modelos experimentais de asma. Observamos uma potencialização da resposta de IL-6 no grupo OVA-LPS da mesma forma que de IL-4 e IL-13. Para confirmar a importância da IL-6 como mecanismo envolvido, confirmamos essa resposta utilizando RT-PCR e imunohistoquímica com avaliação morfológica.

Corroborando com nossas descobertas, Bae et al. (2017) mostraram em animais knockout para IL17A, diminuição de neutrófilos, IL-6 e IL-17. Wakashin et al., (2008) utilizaram inibidores de IL-13 e IL-17 e demonstraram que o bloqueio dessas citocinas protegeu os animais da eosinofilia, hiperplasia do muco e hiperresponsividade das vias aéreas e da inflamação neutrofílica, sugerindo a eficácia de terapias combinadas que controlam as respostas Th2 e Th17. Neste estudo demonstramos que o tratamento anti-IL-17 atenuou as respostas das células IL-4, IL-5 e IL-13 nos septos alveolares nos grupos OVA anti-IL-17 e OVA-LPS anti-IL-17.

A função do Foxp3 é diferenciar e expandir células Treg e é um marcador específico para essa diferenciação (Pyzik e Piccirillo, 2007; Palomares et al., 2010). Depois que as Tregs são ativadas, estas expressam altos níveis de TGF- β e IL-10, que desempenham um papel antiinflamatório (Durrant e Metzger, 2010). Sabe-se que em camundongos, as citocinas de TGF- β e IL-6 são essenciais para a diferenciação de células Th17, induzindo a produção de IL-17A e IL-17F (Korn et al., 2009). Além disso, Chakir et al. (2003) mostraram uma

correlação positiva entre a gravidade da doença e o fenótipo Th17 em pacientes com asma moderada e grave.

Quanto às alterações do remodelamento da matriz extracelular notamos um aumento nas células positivas para MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TGF- β e na fração de volume das fibras de colágenas I e III, decorina, lumican, actina, biglicano, fibronectina e integrina no grupo OVA em relação ao controle. O tratamento com anti-IL-17 nos animais OVA e OVA-LPS reduziu estas respostas. Observou-se no grupo OVA-LPS um aumento nas respostas de MMP-9, MMP-12, TGF- β , fibronectina e biglicano.

No entanto, em relação aos seguintes marcadores: TIMP-1, decorin, lumican e actina não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-LPS. He et al. (2012) mostraram anteriormente que o LPS em culturas celulares leva a um aumento na decorina após 24 horas. No entanto, valores maiores foram observados após 48 horas. Esses resultados corroboram com nossos achados para decorina, uma vez que, observamos um aumento da decorina no grupo OVA-LPS, porém não foi diferente do grupo OVA. Uma possível explicação para os presentes resultados, pode ser relacionado ao fato que o final do protocolo ocorreu após 24 da aplicação do LPS.

Analisando as respostas de lumican, observamos que os grupos OVA e OVA-LPS não foram diferentes. No entanto, anti-IL-17 contribuiu para uma maior redução de lumican nesses grupos. Uma vez que observamos o mesmo padrão de resposta na avaliação do TGF- β , nossa hipótese foi que a redução do TGF- β por anti-IL-17 contribuiu para os efeitos observados na resposta lumican.

Estes dados estão de acordo com krishnan et al. (2012) que mostraram que TGF- β aumenta a expressão lumican.

Em relação à actina, o tratamento anti-IL-17 foi capaz de atenuar a produção de actina no grupo OVA-LPS anti-IL-17. Qin et al. (2012) mostraram que TGF- β também foi capaz de aumentar a expressão da actina em modelos de inflamação alérgica e o bloqueio dessa citocina diminuiu os estímulos da actina. Esses dados vão de encontro os nossos achados, pois o anti-IL-17 atenuou as respostas de TGF- β .

Quanto à integrina $\alpha\text{V}\beta 6$, observamos aumento nos grupos OVA e uma resposta potencializada no OVA-LPS e o tratamento com anti-IL-17 foi capaz de atenuar essas respostas. Em consonância com nossos resultados Tatler et al. (2011) mostraram que a integrina $\alpha\text{V}\beta 6$ é responsável por modular a ativação de TGF- β . Em nosso estudo observamos que em ambos os grupos OVA e OVA-LPS o tratamento com LPS potencializou respostas de TGF- β e o tratamento com o anti-IL-17 mostrou-se eficaz em ambos os grupos.

No presente estudo, demonstramos que a terapia anti-IL-17 neutralizou vários aspectos do processo de remodelamento da matriz extracelular. Quantificamos a fração de volume das fibras de colágeno I e III. Observamos que o tratamento anti-IL-17 atenuou a deposição dessas fibras de colágeno. Estes resultados sugerem que a terapia anti-IL-17 não apenas controla a inflamação, mas também o processo de remodelamento.

Os resultados do presente estudo mostraram um elevado número de células positivas para MMP-9 e MMP-12 no grupo OVA-LPS. Várias citocinas

inflamatórias, como o TNF-alfa e o LPS, estimulam a síntese de MMPs em neutrófilos (Overbeek *et al.*, 2013). O LPS estimula o recrutamento de neutrófilos (Veldhoen e Stockinger, 2006; Wilson *et al.*, 2009; Venancio *et al.*, 2016). Oshita et al. (2003) mostraram que MMP-9 e MMP-12 representam marcadores de inflamação e remodelamento. Além do processo de remodelamento, essas MMPs também participam do processo inflamatório através da modulação do recrutamento de células Th2 ou através da regulação da infiltração de leucócitos no tecido do pulmonar (Ingram e Kraft, 2012).

Além disso, a redução do estresse oxidativo e as vias de sinalização em resposta ao tratamento com anti-IL-17 podem ter contribuído para a redução do remodelamento da matriz extracelular. Observamos um aumento na fração de volume de PGF2- α e do número de células positivas para iNOS, ROCK1, ROCK2 e NF-kB. Estes marcadores foram reduzidos após o tratamento com anti-IL-17.

Righetti et al. (2014) e Possa et al. (2012) mostraram que a inibição de ROCK1 e ROCK 2 contribui para a redução do recrutamento eosinofílico, hiperresponsabilidade e remodelamento um modelo de inflamação alérgica crônica. Essas descobertas apresentaram correlações positivas com as respostas funcionais e os marcadores de inflamação e remodelamento. Esses estudos corroboram nossos resultados, sugerindo que anti-IL-17 foi capaz de controlar essas vias de sinalização.

Em consonância com estes resultados, Prado et al. (2011) demonstraram que o tratamento com um inibidor de iNOS reduziu os níveis de

MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nas vias aéreas em um modelo de inflamação alérgica crônica. Esses mediadores modulam a produção das fibras colágenas e elásticas, contribuindo para a remodelamento da matriz extracelular. Starling et al. (2009) também mostraram uma redução significativa do PGF2- α isoprostano em animais sensibilizados com ovoalbumina e tratados com inibidores específicos de iNOS.

Os fatores de transcrição estão envolvidos em muitos desses processos analisados neste estudo, incluindo NF- κ B, que é considerado um modulador crítico da resposta inflamatória e, portanto, da fisiopatogenia de várias doenças pulmonares (Gosens *et al.*, 2004). Na tentativa de determinar a importância do NF- κ B em um modelo de asma murina, Pantano et al (2008) demonstraram que a ativação epitelial de NF- κ B promoveu neutrofilia e eosinofilia e aumentou os níveis de IL-17 e IL-4. Notadamente, a ativação desta via também pode aumentar os níveis de iNOS e arginase (Ckless et al., 2007; Aristoteles et al., 2013).

Nosso estudo tem algumas limitações. Utilizamos um anticorpo monoclonal para IL-17 em um modelo animal experimental, e não podemos extrapolar diretamente esses achados para aqueles esperados em seres humanos, embora existam vários testes clínicos em andamento para pacientes com asma grave.

Quanto ao processo de remodelamento, avaliamos as alterações imediatamente após o final do protocolo. Seria interessante avaliar se essas alterações seriam mantidas após semanas ou meses do final do experimento.

Além disso, seria interessante a confirmação de todas as alterações observadas pela imunohistoquímica, utilizando outra metodologia, como o ELISA, o que poderá ser realizada em estudos futuros. No presente trabalho fizemos isso apenas para a IL-6, considerando a importância reguladora desta citocina sobre as respostas de CD4, Th2 e Th17 conforme discutido anteriormente.

Contudo, nosso estudo tem muitos pontos fortes. Demonstramos claramente a importância de investigar o perfil Th17 na inflamação alérgica crônica exacerbada pelo LPS. Os resultados permitem pressupor a importância da terapia com anti-IL17 para atenuar e / ou controlar respostas inflamatórias, remodelamento das vias de estresse oxidativo, bem como demonstram a relevância de mecanismos como a ativação de NF- κ B e ROCK-1 e 2 nos pulmões com inflamação alérgica mesmo quando ocorre um segundo estímulo inflamatório induzido pela exacerbação. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para revelar outras vias que possam estar envolvidas nessas respostas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbado ou não por LPS pode-se observar que o efeito do tratamento com anti-IL-17 foi capaz de atenuar:

1. Resposta inflamatória nos diferentes perfis (Th1, Th2 e Th17), quimionas e formação de edema;
2. Respostas das células T reguladoras e células apresentadoras de antígenos, contribuindo assim para a diminuição do processo inflamatório;
3. Os marcadores do processo de remodelamento, proteoglicanos e modular a deposição de colágeno e integrina a expressão celular de MMP-9, MMP-12, TIMP-1 e TGF- β responsáveis por alterarem a composição da matriz extracelular;
4. Os marcadores de estresse oxidativo com a redução da expressão de iNOS e 8-iso-PGF2 α ;
5. A expressão de NF-kB e ROCK-1 e ROCK-2, demonstrando a importância dessas vias de sinalização neste modelo experimental.

Cabe ressaltar que o tratamento com anti-IL-17 no grupo OVA anti-IL-17 reverteu grande parte dos marcadores avaliados, sendo eles: Neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, IL-6, IL-10, CD4, CD8, TARC, iNOS, isoprostano, MMP-9, decorina, biglicano, actina, fibras colágenas tipo I, e NF-kB.

Além disso, conseguimos demonstrar a importância do modelo de exacerbação que utilizamos no nosso trabalho, sendo um modelo animal útil para estudo das respostas nas quais o hospedeiro que sofre uma infecção bacteriana exacerba um processo alérgico crônico.

REFERÊNCIAS

7 Referências

ABDELMAGEED, M. E. et al. LPS-RS attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves NF-kappaB inhibition. **Can J Physiol Pharmacol**, p. 1-7, Jul 20 2015. ISSN 1205-7541 (Electronic) 0008-4212 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26544923>.

ABELIUS, M. S. et al. High cord blood levels of the T-helper 2-associated chemokines CCL17 and CCL22 precede allergy development during the first 6 years of life. **Pediatr Res**, v. 70, n. 5, p. 495-500, Nov 2011. ISSN 1530-0447 (Electronic) 0031-3998 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21796021>.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15229469>.

AL-MUHSEN, S.; JOHNSON, J. R.; HAMID, Q. Remodeling in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 128, n. 3, p. 451-62; quiz 463-4, Sep 2011. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21636119>.

AL-RAMLI, W. et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 5, p. 1185-7, May 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19361847>.

ALCORN, J. F.; CROWE, C. R.; KOLLS, J. K. TH17 cells in asthma and COPD. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 495-516, 2010. ISSN 1545-1585 (Electronic) 0066-4278 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20148686>.

ANGELI, P. et al. 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**, v. 294, n. 6, p. L1197-205, Jun 2008. ISSN 1040-0605 (Print)

1040-0605 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18359886 >.

ARANTES-COSTA, F. M. et al. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. **Toxicol Pathol**, v. 36, n. 5, p. 680-6, Jul 2008. ISSN 1533-1601 (Electronic)
 0192-6233 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18477768 >.

ARAUJO, B. B. et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. **Eur Respir J**, v. 32, n. 1, p. 61-9, Jul 2008. ISSN 1399-3003 (Electronic)
 0903-1936 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18321931 >.

ARISTOTELES, L. R. et al. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. **BMC Pulm Med**, v. 13, p. 52, Aug 15 2013. ISSN 1471-2466 (Electronic)
 1471-2466 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23947680 >.

BAE, J. S. et al. The Role of IL-17 in a Lipopolysaccharide-Induced Rhinitis Model. **Allergy Asthma Immunol Res**, v. 9, n. 2, p. 169-176, Mar 2017. ISSN 2092-7355 (Print)
 2092-7355 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28102062 >.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v. 250, n. 2, p. 91-104, Aug 2001. ISSN 0954-6820 (Print)
 0954-6820 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11489059 >.

BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Blocking chemokine receptors. **J Exp Med**, v. 186, n. 8, p. 1189-91, Oct 20 1997. ISSN 0022-1007 (Print)
 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9379143 >.

BARLOW, J. L. et al. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. **Clin Exp Allergy**, v. 41, n. 10, p. 1447-55, Oct 2011. ISSN 1365-2222 (Electronic)

0954-7894 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21722219 >.

BARNES, P. J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, n. 3, p. 636-45, Mar 2013. ISSN 1097-6825 (Electronic)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23360759 >.

BELL, S. G. The story of nitric oxide: from rascally radical to miracle molecule. **Neonatal Netw**, v. 23, n. 4, p. 47-51, Jul-Aug 2004. ISSN 0730-0832 (Print)
 0730-0832 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15317378 >.

BENAYOUN, L.; PRETOLANI, M. [Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutic perspectives]. **Med Sci (Paris)**, v. 19, n. 3, p. 319-26, Mar 2003. ISSN 0767-0974 (Print)
 0767-0974 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12836414 >.

BERIN, M. C. The Role of TARC in the Pathogenesis of Allergic Asthma. **Drug News Perspect**, v. 15, n. 1, p. 10-16, Jan 2002. ISSN 0214-0934 (Print)
 0214-0934 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12677239 >.

BESNARD, A. G. et al. Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation. **J Mol Cell Biol**, v. 4, n. 1, p. 3-10, Feb 2012. ISSN 1759-4685 (Electronic)
 1759-4685 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22147847 >.

BOUSQUET, J. et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 5, p. 926-38, Nov 2010. ISSN 1097-6825 (Electronic)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20926125 >.

BUC, M. et al. Immunopathogenesis of bronchial asthma. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 57, n. 5, p. 331-44, Sep-Oct 2009. ISSN 1661-4917 (Electronic)

0004-069X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19688187 >.

BULLENS, D. M. et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? **Respir Res**, v. 7, p. 135, Nov 3 2006. ISSN 1465-993X (Electronic)
 1465-9921 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17083726 >.

BURGESS, J. K. et al. The extracellular matrix - the under-recognized element in lung disease? **J Pathol**, v. 240, n. 4, p. 397-409, Dec 2016. ISSN 1096-9896 (Electronic)
 0022-3417 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27623753 >.

BUSSE, W. W.; LEMANSKE, R. F., JR.; GERN, J. E. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. **Lancet**, v. 376, n. 9743, p. 826-34, Sep 4 2010. ISSN 1474-547X (Electronic)
 0140-6736 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20816549 >.

CAMPO, P. et al. Phenotypes and endotypes of uncontrolled severe asthma: new treatments. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 23, n. 2, p. 76-88; quiz 1 p follow 88, 2013. ISSN 1018-9068 (Print)
 1018-9068 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23654073 >.

CARDOSO, T. A. et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **J Bras Pneumol**, v. 43, n. 3, p. 163-168, May-Jun 2017. ISSN 1806-3756 (Electronic)
 1806-3713 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28746526 >.

CHAKIR, J. et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 6, p. 1293-8, Jun 2003. ISSN 0091-6749 (Print)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12789232 >.

CHAN-YEUNG, M.; BECKER, A. Primary prevention of childhood asthma and allergic disorders. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 6, n. 3, p. 146-51, Jun 2006. ISSN 1528-4050 (Print)

1473-6322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16670504>.

CHEN, Z. et al. Nuclear factor-kappaB-like activity increases in murine cerebral cortex after sleep deprivation. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6 Pt 2, p. R1812-8, Jun 1999. ISSN 0002-9513 (Print)
 0002-9513 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10362764>.

CHOU, F. C. et al. Differential modulation of IL-12 family cytokines in autoimmune islet graft failure in mice. **Diabetologia**, v. 60, n. 12, p. 2409-2417, Dec 2017. ISSN 1432-0428 (Electronic)
 0012-186X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28929188>.

COHN, L.; ELIAS, J. A.; CHUPP, G. L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 789-815, 2004. ISSN 0732-0582 (Print)
 0732-0582 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15032597>.

DE BOEVER, E. H. et al. Efficacy and safety of an anti-IL-13 mAb in patients with severe asthma: a randomized trial. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 4, p. 989-96, Apr 2014. ISSN 1097-6825 (Electronic)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24582316>.

DENG, G. et al. Lianqinjiedu decoction attenuates LPS-induced inflammation and acute lung injury in rats via TLR4/NF-kappaB pathway. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 148-152, Dec 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic)
 0753-3322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28972887>.

DIEHL, S.; RINCON, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, v. 39, n. 9, p. 531-6, Dec 2002. ISSN 0161-5890 (Print)
 0161-5890 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12431386>.

DOE, C. et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. **Chest**, v. 138, n. 5, p. 1140-7, Nov 2010. ISSN 1931-3543 (Electronic)

0012-3692 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20538817 >.

DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; LUDWIG, M. S. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 5 Pt 1, p. 1750-7, Nov 1999. ISSN 1073-449X (Print)
 1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10556151 >.

DURRANT, D. M.; METZGER, D. W. IL-12 can alleviate Th17-mediated allergic lung inflammation through induction of pulmonary IL-10 expression. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 3, p. 301-11, May 2010. ISSN 1935-3456 (Electronic)
 1933-0219 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20237464 >.

EUSTACE, A. et al. Identification of cells expressing IL-17A and IL-17F in the lungs of patients with COPD. **Chest**, v. 139, n. 5, p. 1089-1100, May 2011. ISSN 1931-3543 (Electronic)
 0012-3692 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20864612 >.

FAHY, J. V. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. **Proc Am Thorac Soc**, v. 6, n. 3, p. 256-9, May 1 2009. ISSN 1546-3222 (Print)
 1546-3222 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19387026 >.

FAJT, M. L. Blood eosinophils: the Holy Grail for asthma phenotyping? **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 116, n. 2, p. 90-1, Feb 2016. ISSN 1534-4436 (Electronic)
 1081-1206 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26815702 >.

FISCHER, A. et al. Mediators of asthma: nitric oxide. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 15, n. 2, p. 73-81, 2002. ISSN 1094-5539 (Print)
 1094-5539 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12090780 >.

FODOR, R. S. et al. Time- and dose-dependent severity of lung injury in a rat model of sepsis. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 4, p. 1329-37, 2016. ISSN 1220-0522 (Print)

1220-0522 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26743278>.

FU, X. et al. The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca²⁺-sensitization of smooth muscle. **FEBS Lett**, v. 440, n. 1-2, p. 183-7, Nov 27 1998. ISSN 0014-5793 (Print)
 0014-5793 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9862451>.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 1, p. 32-9, Jan 2001. ISSN 0165-6147 (Print)
 0165-6147 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11165670>.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nat Med**, v. 18, n. 5, p. 693-704, May 4 2008. ISSN 1546-170X (Electronic)
 1078-8956 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22561833>.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 225-60, 1998. ISSN 0732-0582 (Print)
 0732-0582 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9597130>.

GONG, M. C. et al. Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 3, p. 1340-5, Feb 6 1996. ISSN 0027-8424 (Print)
 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8577766>.

GOSENS, R. et al. Role of Rho-kinase in maintaining airway smooth muscle contractile phenotype. **Eur J Pharmacol**, v. 483, n. 1, p. 71-8, Jan 1 2004. ISSN 0014-2999 (Print)
 0014-2999 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14709328>.

GU, Z. W.; WANG, Y. X.; CAO, Z. W. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 22361-22369, Apr 4 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28423590 >.

GUEDERS, M. M. et al. Matrix metalloproteinase-8 deficiency promotes granulocytic allergen-induced airway inflammation. **J Immunol**, v. 175, n. 4, p. 2589-97, Aug 15 2005. ISSN 0022-1767 (Print)
 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16081833 >.

HALWANI, R.; AL-MUHSEN, S.; HAMID, Q. T helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside. **Chest**, v. 143, n. 2, p. 494-501, Feb 1 2013. ISSN 1931-3543 (Electronic)
 0012-3692 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23381314 >.

HAMID, Q. et al. Inflammation of small airways in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 100, n. 1, p. 44-51, Jul 1997. ISSN 0091-6749 (Print)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9257786 >.

HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annu Rev Physiol**, v. 71, p. 489-507, 2009. ISSN 1545-1585 (Electronic)
 0066-4278 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19575684 >.

HART, L. A. et al. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 158, n. 5 Pt 1, p. 1585-92, Nov 1998. ISSN 1073-449X (Print)
 1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9817712 >.

HASHIMOTO, Y.; NAKAHARA, K. Improvement of asthma after administration of pioglitazone. **Diabetes Care**, v. 25, n. 2, p. 401, Feb 2002. ISSN 0149-5992 (Print)
 0149-5992 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11815521 >.

HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. **J Exp Med**, v. 202, n. 11, p. 1459-63, Dec 5 2005. ISSN 0022-1007 (Print)
 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16330811 >.

HE, W. et al. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. **Int Endod J**, v. 46, n. 2, p. 128-36, Feb 2012. ISSN 1365-2591 (Electronic) 0143-2885 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22788664 >.

HEBEL, K. et al. IL-1beta and TGF-beta act antagonistically in induction and differentially in propagation of human proinflammatory precursor CD4+ T cells. **J Immunol**, v. 187, n. 11, p. 5627-35, Dec 1 2011. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22048775 >.

HENRY, P. J.; MANN, T. S.; GOLDIE, R. G. A rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 18, n. 1, p. 67-74, 2005. ISSN 1094-5539 (Print) 1094-5539 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15607129 >.

HIRATA, K.; TANAKA, S.; SHOJI, S. [Cough variant asthma]. **Nihon Naika Gakkai Zasshi**, v. 85, n. 2, p. 240-4, Feb 10 1996. ISSN 0021-5384 (Print) 0021-5384 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8708454 >.

HISCOTT, J. et al. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 10, p. 6231-40, Oct 1993. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8413223 >.

HOGAN, S. P. Recent advances in eosinophil biology. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 143 Suppl 1, p. 3-14, 2007. ISSN 1423-0097 (Electronic) 1018-2438 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17541270 >.

HOLGATE, S. T. Trials and tribulations in identifying new biologic treatments for asthma. **Trends Immunol**, v. 33, n. 5, p. 238-46, May 2012. ISSN 1471-4981 (Electronic) 1471-4906 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22436378 >.

HUEBER, W. et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 52, p. 52ra72, Oct 6 2010. ISSN 1946-6242 (Electronic) 1946-6234 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20926833 >.

HUSAIN, S.; JAFRI, F.; CROSSON, C. E. Acute effects of PGF2alpha on MMP-2 secretion from human ciliary muscle cells: a PKC- and ERK-dependent process. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, n. 5, p. 1706-13, May 2005. ISSN 0146-0404 (Print) 0146-0404 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15851572 >.

HUSSAIN, I.; KLINE, J. N. CpG oligodeoxynucleotides in asthma. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 2, n. 7, p. 914-8, Jul 2001. ISSN 1472-4472 (Print) 1472-4472 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11757790 >.

INGRAM, J. L.; KRAFT, M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. **J Allergy Clin Immunol**, v. 130, n. 4, p. 829-42; quiz 843-4, Oct 2012. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22951057 >.

ISHIZAKI, T. et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. **Mol Pharmacol**, v. 57, n. 5, p. 976-83, May 2000. ISSN 0026-895X (Print) 0026-895X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779382 >.

JAMES, A. Airway remodeling in asthma. **Curr Opin Pulm Med**, v. 11, n. 1, p. 1-6, Jan 2005. ISSN 1070-5287 (Print) 1070-5287 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15591881 >.

JAMES, A. L.; WENZEL, S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. **Eur Respir J**, v. 30, n. 1, p. 134-55, Jul 2007. ISSN 0903-1936 (Print) 0903-1936 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17601971 >.

JANSSEN, L. J. et al. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, n. 2, p. 506-11, Nov 2000. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11046082>.

KALAMAJSKI, S.; OLDBERG, A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. **Matrix Biol**, v. 29, n. 4, p. 248-53, May 2010. ISSN 1569-1802 (Electronic)
 0945-053X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20080181>.

KAMINSKA, M. et al. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. **J Allergy Clin Immunol**, v. 124, n. 1, p. 45-51 e1-4, Jul 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19481790>.

KISS, T. et al. Comparison of different degrees of variability in tidal volume to prevent deterioration of respiratory system elastance in experimental acute lung inflammation. **Br J Anaesth**, v. 116, n. 5, p. 708-15, May 2016. ISSN 1471-6771 (Electronic)
 0007-0912 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27106975>.

KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. P. Modulation of Ca²⁺ sensitivity by agonists in smooth muscle. **Adv Exp Med Biol**, v. 304, p. 97-109, 1991. ISSN 0065-2598 (Print)
 0065-2598 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1803926>.

KOBAYASHI, Y. Interview with Dr. Yoshiro Kobayashi regarding Pivotal Advance: A suppressive role of nitric oxide in MIP-2 production by macrophages upon coculturing with apoptotic cells. Interview by Helene F. Rosenberg and Joost J. Oppenheim. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 4, p. 742-3, Oct 2006. ISSN 0741-5400 (Print)
 0741-5400 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16855063>.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)
 0732-0582 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19132915>.

KOTARU, C. et al. Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 11, p. 1208-15, Jun 1 2006. ISSN 1073-449X (Print)
1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16543551 >.

KRISHNAN, A. et al. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. **Lab Invest**, v. 92, n. 12, p. 1712-25, Dec 2012. ISSN 1530-0307 (Electronic)
0023-6837 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23007134 >.

KUDO, M. et al. IL-17A produced by alphabeta T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. **Nat Med**, v. 18, n. 4, p. 547-54, Mar 4 2012. ISSN 1546-170X (Electronic)
1078-8956 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22388091 >.

KUME, H. RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 27, p. 2876-85, 2008. ISSN 0929-8673 (Print)
0929-8673 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18991642 >.

KUREISHI, Y. et al. Regulation of Ca²⁺-independent smooth muscle contraction by alternative staurosporine-sensitive kinase. **Eur J Pharmacol**, v. 376, n. 3, p. 315-20, Jul 9 1999. ISSN 0014-2999 (Print)
0014-2999 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10448893 >.

LAGRUE, G. et al. Basophil sensitization for food allergens in idiopathic nephrotic syndrome. **Nephron**, v. 42, n. 2, p. 123-7, 1986. ISSN 1660-8151 (Print)
1660-8151 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3945350 >.

LAI, C. K. et al. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 64, n. 6, p. 476-83, Jun 2009. ISSN 1468-3296 (Electronic)
0040-6376 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19237391 >.

LAZAAR, A. L.; PANETTIERI, R. A., JR. Is airway remodeling clinically relevant in asthma? **Am J Med**, v. 115, n. 8, p. 652-9, Dec 1 2003. ISSN 0002-9343 (Print)

0002-9343 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14656618 >.

LEMANSKE, R. F., JR. Asthma therapies revisited: what have we learned?

Proc Am Thorac Soc, v. 6, n. 3, p. 312-5, May 1 2009. ISSN 1546-3222 (Print) 1546-3222 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19387036 >.

LEMANSKE, R. F., JR.; BUSSE, W. W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S95-102, Feb 2010. ISSN 1097-6825 (Electronic)

0091-6749 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20176271 >.

LI, Z. Q. et al. [Nitric oxide is involved in the modulation of central respiratory rhythm]. **Sheng Li Xue Bao**, v. 55, n. 5, p. 560-4, Oct 25 2003. ISSN 0371-0874 (Print)

0371-0874 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14566404 >.

LINDLEY, P.; WALKER, S. N. Theoretical and methodological differentiation of moderation and mediation. **Nurs Res**, v. 42, n. 5, p. 276-9, Sep-Oct 1993. ISSN 0029-6562 (Print)

0029-6562 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8415040 >.

LLOYD, A. W. Monitor: molecules and profiles. **Drug Discov Today**, v. 5, n. 10, p. 477-480, Oct 1 2000. ISSN 1878-5832 (Electronic)

1359-6446 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11018599 >.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 838-48, Dec 2010. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21060320 >.

LOWE, A. P. et al. LPS exacerbates functional and inflammatory responses to ovalbumin and decreases sensitivity to inhaled fluticasone propionate in a guinea pig model of asthma. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 10, p. 2588-603, May 2015. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25586266>.

LUKACS, N. W.; OLIVEIRA, S. H.; HOGABOAM, C. M. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? **J Clin Invest**, v. 104, n. 8, p. 995-9, Oct 1999. ISSN 0021-9738 (Print)
 0021-9738 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10525033>.

MALLOL, J. et al. Changes in the prevalence and severity of recurrent wheezing in infants: The results of two surveys administered 7 years apart. **J Asthma**, p. 1-9, Dec 12 2017. ISSN 1532-4303 (Electronic)
 0277-0903 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=29231772>.

MANUYAKORN, W.; HOWARTH, P. H.; HOLGATE, S. T. Airway remodelling in asthma and novel therapy. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 31, n. 1, p. 3-10, Mar 2013. ISSN 0125-877X (Print)
 0125-877X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23517388>.

MAUAD, T. et al. The role of the collagenous and elastic system fibers in modulating bronchoconstriction. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 9, p. 1195-9, Sep 1996. ISSN 0100-879X (Print)
 0100-879X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9181063>.

_____. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, n. 8, p. 857-62, Oct 15 2004. ISSN 1073-449X (Print)
 1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15151920>.

MENDEN, H. L. et al. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 2 Regulates LPS-Induced Inflammation and Alveolar Remodeling in the Developing Lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 55, n. 6, p. 767-778, Dec 2016. ISSN 1535-4989 (Electronic)
 1044-1549 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27438994>.

MICHALIK, M. et al. Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 7, p. BR194-201, Jul 2009. ISSN 1643-3750 (Electronic)

1234-1010 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19564819 >.

MICILLO, E. et al. Respiratory infections and asthma. **Allergy**, v. 55 Suppl 61, p. 42-5, 2000. ISSN 0105-4538 (Print)
 0105-4538 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10919505 >.

MILNE, G. L.; YIN, H.; MORROW, J. D. Human biochemistry of the isoprostane pathway. **J Biol Chem**, v. 283, n. 23, p. 15533-7, Jun 6 2008. ISSN 0021-9258 (Print)
 0021-9258 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18285331 >.

MINTZ-COLE, R. A. et al. Dectin-1 and IL-17A suppress murine asthma induced by *Aspergillus versicolor* but not *Cladosporium cladosporioides* due to differences in beta-glucan surface exposure. **J Immunol**, v. 189, n. 7, p. 3609-17, Oct 1 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)
 0022-1767 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22962686 >.

MONTUSCHI, P. et al. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 1, p. 216-20, Jul 1999. ISSN 1073-449X (Print)
 1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10390403 >.

MORROW, J. D. The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 8, p. 895-902, 2006. ISSN 1381-6128 (Print)
 1381-6128 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16533158 >.

MURAKAMI, D. et al. Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. **Clin Exp Allergy**, v. 37, n. 3, p. 339-47, Mar 2007. ISSN 0954-7894 (Print)
 0954-7894 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17359384 >.

NAKAMURA, H. et al. Eotaxin and impaired lung function in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, n. 6, p. 1952-6, Dec 1999. ISSN 1073-449X (Print)

1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10588612 >.

NAKASHIMA, A. S. et al. Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. **J Appl Physiol** (1985), v. 104, n. 6, p. 1778-85, Jun 2008. ISSN 8750-7587 (Print)
 0161-7567 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18388250 >.

NEMBRINI, C.; MARSLAND, B. J.; KOPF, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 5, p. 986-94; quiz 995-6, May 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic)
 0091-6749 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19410688 >.

NEWCOMB, L. L. et al. Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. **J Virol**, v. 83, n. 1, p. 29-36, Jan 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic)
 0022-538X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18945782 >.

NIRULA, A. et al. Effect of IL-17 receptor A blockade with brodalumab in inflammatory diseases. **Rheumatology (Oxford)**, v. 55, n. suppl 2, p. ii43-ii55, Dec 2016. ISSN 1462-0332 (Electronic)
 1462-0324 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27856660 >.

NORMANTON, M.; MARTI, L. C. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 11, n. 2, p. 237-46, Apr-Jun 2013. ISSN 2317-6385 (Electronic)
 1679-4508 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23843069 >.

OSHITA, Y. et al. Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. **Thorax**, v. 58, n. 9, p. 757-60, Sep 2003. ISSN 0040-6376 (Print)
 0040-6376 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12947131 >.

OVERBEEK, S. A. et al. Cigarette smoke-induced collagen destruction; key to chronic neutrophilic airway inflammation? **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55612, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23383243 >.

PALOMARES, O. et al. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 5, p. 1232-40, May 2010. ISSN 1521-4141 (Electronic)
 0014-2980 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20148422 >.

PAPP, K. A. et al. Anti-IL-17 receptor antibody AMG 827 leads to rapid clinical response in subjects with moderate to severe psoriasis: results from a phase I, randomized, placebo-controlled trial. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 10, p. 2466-2469, Oct 2012. ISSN 1523-1747 (Electronic)
 0022-202X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22622425 >.

PEEBLES, R. S., JR. A new horizon in asthma: inhibiting ILC function. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 174, p. 174fs7, Feb 27 2013. ISSN 1946-6242 (Electronic)
 1946-6234 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23447016 >.

PETRONI, R. C. et al. Hypertonic Saline (NaCl 7.5%) Reduces LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p. 2026-35, Dec 2015. ISSN 1573-2576 (Electronic)
 0360-3997 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25962375 >.

PIGATI, P. A. et al. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. **BMC Pulm Med**, v. 15, p. 85, Aug 12 2015. ISSN 1471-2466 (Electronic)
 1471-2466 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26264367 >.

PINHEIRO, N. M. et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120441, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)
 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25816137 >.

PINI, L. et al. Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. **Eur Respir J**, v. 29, n. 1, p. 71-7, Jan 2007. ISSN 0903-1936 (Print)

0903-1936 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17050562 >.

POON, A. H. et al. Pathogenesis of severe asthma. **Clin Exp Allergy**, v. 42, n. 5, p. 625-37, May 2012.

POSSA, S. S. et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 303, n. 11, p. L939-52, Dec 1 2012. ISSN 1522-1504 (Electronic) 1040-0605 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23002076 >.

POSTMA, D. S.; TIMENS, W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**, v. 3, n. 5, p. 434-9, Jul 2006. ISSN 1546-3222 (Print) 1546-3222 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16799088 >.

PRADO, C. M. et al. Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 4, p. L677-83, Oct 2005. ISSN 1040-0605 (Print) 1040-0605 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15937069 >.

_____. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 35, n. 4, p. 457-65, Oct 2006. ISSN 1044-1549 (Print) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16709960 >.

PRICE, D.; FLETCHER, M.; VAN DER MOLEN, T. Asthma control and management in 8,000 European patients: the REcognise Asthma and Link to Symptoms and Experience (REALISE) survey. **NPJ Prim Care Respir Med**, v. 24, p. 14009, Jun 12 2014. ISSN 2055-1010 (Electronic) 2055-1010 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24921985 >.

PUIG, L. Brodalumab: the first anti-IL-17 receptor agent for psoriasis. **Drugs Today (Barc)**, v. 53, n. 5, p. 283-297, May 2017. ISSN 1699-3993 (Print) 1699-3993 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28650001 >.

PYZIK, M.; PICCIRILLO, C. A. TGF-beta1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4+ T cell subsets. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 2, p. 335-46, Aug 2007. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17475784 >.

QIN, J. et al. COUP-TFII inhibits TGF-beta-induced growth barrier to promote prostate tumorigenesis. **Nature**, v. 493, n. 7431, p. 236-40, Jan 10 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23201680 >.

REDDEL, H. K. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, n. 1, p. 59-99, Jul 1 2009. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19535666 >.

REDINGTON, A. E.; HOWARTH, P. H. Airway wall remodelling in asthma.

Thorax, v. 52, n. 4, p. 310-2, Apr 1997. ISSN 0040-6376 (Print)

0040-6376 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9196510 >.

RICCIARDOLO, F. L. cNOS-iNOS paradigm and arginase in asthma. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 11, p. 560-1; author reply 562-3, Nov 2003. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: <

0165-6147 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14607075 >.

RIETSCHER, E. T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J**, v. 8, n. 2, p. 217-25, Feb 1994. ISSN 0892-6638 (Print)

0892-6638 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8119492 >.

RIGHETTI, R. F. et al. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 192, p. 134-46, Feb 1 2014. ISSN 1878-1519 (Electronic)

1569-9048 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24373838 >.

RINCON, M.; IRVIN, C. G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1281-90, 2012. ISSN 1449-2288 (Electronic) 1449-2288 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23136556 >.

RODWAY, G. W. et al. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. **Chron Respir Dis**, v. 6, n. 1, p. 19-29, 2009. ISSN 1479-9723 (Print) 1479-9723 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19176709 >.

ROUSSEL, L. et al. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. **J Immunol**, v. 184, n. 8, p. 4531-7, Apr 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20228195 >.

SAKODA, C. P. P. et al. Sakuranetin reverses vascular peribronchial and lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic pulmonary inflammation. **Acta Histochem**, v. 118, n. 6, p. 615-624, Jul 2016. ISSN 1618-0372 (Electronic) 0065-1281 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27425653 >.

SALERNO, F. G.; DALLAIRE, M.; LUDWIG, M. S. Does the anatomic makeup of parenchymal lung strips affect oscillatory mechanics during induced constriction? **J Appl Physiol (1985)**, v. 79, n. 1, p. 66-72, Jul 1995. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7559249 >.

SANDROCK, C. E.; NORRIS, A. Infection in severe asthma exacerbations and critical asthma syndrome. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 48, n. 1, p. 104-13, Feb 2014. ISSN 1559-0267 (Electronic) 1080-0549 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24984968 >.

SANTOS, A. et al. Effects on Pulmonary Vascular Mechanics of Two Different Lung-Protective Ventilation Strategies in an Experimental Model of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Crit Care Med**, v. 45, n. 11, p. e1157-e1164, Nov 2017. ISSN 1530-0293 (Electronic)

0090-3493 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28872540 >.

SARKAR, S. et al. Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. R158, 2009. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19852819 >.

SCHNYDER-CANDRIAN, S. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. **J Exp Med**, v. 203, n. 12, p. 2715-25, Nov 27 2006. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17101734 >.

SCHWARTZ, R. S. A new element in the mechanism of asthma. **N Engl J Med**, v. 346, n. 11, p. 857-8, Mar 14 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893801 >.

SCOTT, H. A.; WOOD, L. G.; GIBSON, P. G. What About Neutrophils in Obese Asthma? **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 55, n. 3, p. 462, Sep 2016. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27585405 >.

SEITZMAN, G. D. et al. Lung lymphocytes proliferate minimally in the murine pulmonary immune response to intratracheal sheep erythrocytes. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 18, n. 6, p. 800-12, Jun 1998. ISSN 1044-1549 (Print) 1044-1549 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9618385 >.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v. 189, n. 11, p. 1777-82, Jun 7 1999. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10359581 >.

SHIRAKI, A. et al. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF 2 alpha-induced contraction in airway smooth muscle. **Clin Exp Allergy**, v. 39, n. 2, p. 236-45, Feb 2009. ISSN 1365-2222 (Electronic)

0954-7894 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19134015 >.

SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W. A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. **Free Radic Biol Med**, v. 25, n. 4-5, p. 392-403, Sep 1998. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9741578 >.

STARKHAMMAR, M. et al. Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32110, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22355412 >.

STARLING, C. M. et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 165, n. 2-3, p. 185-94, Feb 28 2009. ISSN 1569-9048 (Print) 1569-9048 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19118648 >.

STARNES, B. W. et al. Management of ruptured abdominal aortic aneurysm in the endovascular era. **J Vasc Surg**, v. 51, n. 1, p. 9-17; discussion 17-8, Jan 2010. ISSN 1097-6809 (Electronic) 0741-5214 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19883986 >.

TAHER, Y. A.; HENRICKS, P. A.; VAN OOSTERHOUT, A. J. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement. **Libyan J Med**, v. 5, Jun 21 2010. ISSN 1819-6357 (Electronic) 1819-6357 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21483568 >.

TAI, A. et al. The association between childhood asthma and adult chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 69, n. 9, p. 805-10, Sep 2014. ISSN 1468-3296 (Electronic) 0040-6376 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24646659 >.

TAKI, F. et al. Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. **Clin Exp Allergy**, v. 37, n. 4, p. 599-607, Apr 2007. ISSN 0954-7894 (Print) 0954-7894 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17430358 >.

TANG, L. P. et al. Anti-inflammatory effects of Reduning Injection on lipopolysaccharide-induced acute lung injury of rats. **Chin J Integr Med**, v. 20, n. 8, p. 591-9, Aug 2014. ISSN 1672-0415 (Print) 1672-0415 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24916807 >.

TIBERIO, I. F. et al. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, n. 5, p. 1739-47, May 1997. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9154886 >.

TILLIE-LEBLOND, I.; GOSSET, P.; TONNEL, A. B. Inflammatory events in severe acute asthma. **Allergy**, v. 60, n. 1, p. 23-9, Jan 2005. ISSN 0105-4538 (Print) 0105-4538 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15575926 >.

TOLEDO, A. C. et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 7, p. 1736-49, Apr 2012. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23170811 >.

TRIPATHI, A. K.; SULLIVAN, D. J.; STINS, M. F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. **Infect Immun**, v. 74, n. 6, p. 3262-70, Jun 2006. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16714553 >.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 290, n. 2, p. G377-85, Feb 2006. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16223948 >.

TULIC, M. K.; HAMID, Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. **Chest**, v. 123, n. 3 Suppl, p. 348S-55S, Mar 2003. ISSN 0012-3692 (Print)

0012-3692 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12628971>.

TURINO, G. M. The lung parenchyma--a dynamic matrix. J. Burns Amberson lecture. **Am Rev Respir Dis**, v. 132, n. 6, p. 1324-34, Dec 1985. ISSN 0003-0805 (Print)

0003-0805 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3907445>.

UBEL, C. et al. Role of Tyk-2 in Th9 and Th17 cells in allergic asthma. **Sci Rep**, v. 4, p. 5865, Aug 11 2014. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25109392>.

UEHATA, M. et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-4, Oct 30 1997. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353125>.

VELDHOEN, M.; STOCKINGER, B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. **Trends Immunol**, v. 27, n. 8, p. 358-61, Aug 2006. ISSN 1471-4906 (Print)

1471-4906 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16793343>.

VENANCIO, T. M. et al. CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis. **Mediators Inflamm**, v. 2016, p. 1784014, 2016. ISSN 1466-1861 (Electronic)

0962-9351 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27293313>.

VIGNOLA, A. M. et al. New evidence of inflammation in asthma. **Thorax**, v. 55 Suppl 2, p. S59-60, Oct 2000. ISSN 0040-6376 (Print)

0040-6376 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10992562>.

WANG, F. et al. Tim-3 ligand galectin-9 reduces IL-17 level and accelerates *Klebsiella pneumoniae* infection. **Cell Immunol**, v. 269, n. 1, p. 22-8, 2011. ISSN 1090-2163 (Electronic) 0008-8749 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21453908 >.

WANG, Y. H.; WILLS-KARP, M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 11, n. 5, p. 388-94, Oct 2011. ISSN 1534-6315 (Electronic) 1529-7322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21773747 >.

WAY, E. E.; CHEN, K.; KOLLS, J. K. Dysregulation in lung immunity - the protective and pathologic Th17 response in infection. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 12, p. 3116-24, Dec 2013. ISSN 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24130019 >.

WEATHINGTON, N. M. et al. IL-4 Induces IL17Rb Gene Transcription in Monocytic Cells with Coordinate Autocrine IL-25 Signaling. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 57, n. 3, p. 346-354, Sep 2017. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=28421819 >.

WEGMANN, M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 45, n. 4, p. 667-74, Oct 2011. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21474432 >.

WENZEL, S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. **Clin Exp Allergy**, v. 42, n. 5, p. 650-8, May 2012. ISSN 1365-2222 (Electronic) 0954-7894 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22251060 >.

WILSON, R. H. et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, n. 8, p. 720-30, Oct 15 2009. ISSN 1535-4970 (Electronic) 1073-449X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19661246 >.

WOODRUFF, P. G. et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 180, n. 5, p. 388-95, Sep 1 2009. ISSN 1535-4970 (Electronic)

1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19483109 >.

XIAO, W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 6, p. 425-35, Dec 2004. ISSN 1672-7681 (Print) 1672-7681 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16293211 >.

XISTO, D. G. et al. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 8, p. 829-37, Apr 15 2005. ISSN 1073-449X (Print) 1073-449X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15657464 >.

YANG, J. et al. Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and RORgamma t. **Eur J Immunol**, v. 38, n. 5, p. 1204-14, May 2008. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18412165 >.

8

ANEXO

Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS

Leandro do Nascimento Camargo¹, Renato Fraga Righetti^{1,2}, Luciana Ritha de Cássia Rolim Barbosa Aristóteles¹, Tabata Maruyama dos Santos¹, Flávia Castro Ribas de Souza¹, Silvia Fukuzaki¹, Maysa Mariana Cruz³, Maria Isabel Cardoso Alonso-Vale³, Beatriz Manguera Saraiva-Romanholo¹, Carla Máximo Prado⁴, Milton de Arruda Martins¹, Edna Aparecida Leick¹ and Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério^{1*}

¹ Department of Medical Sciences, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil, ³ Department of Biological Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴ Department of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Detlef Neumann,
Hannover Medical School, Germany

Reviewed by:

Benedikt Fritzsche,
Universität Heidelberg, Germany
Andreas Schwingshackl,
University of California, Los Angeles,
United States

*Correspondence:

Iolanda de Fátima Lopes Calvo
Tibério
iocalvo@uol.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Cytokines and Soluble
Mediators in Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 17 August 2017

Accepted: 05 December 2017

Published: 05 January 2018

Citation:

Camargo LN, Righetti RF, Aristóteles LRCB, dos Santos TM, de Souza FCR, Fukuzaki S, Cruz MM, Alonso-Vale MIC, Saraiva-Romanholo BM, Prado CM, Martins MA, Leick EA and Tibério IFLC (2018) Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. *Front. Immunol.* 8:1835. doi: 10.3389/fimmu.2017.01835

Inflammation plays a central role in the development of asthma, which is considered an allergic disease with a classic Th2 inflammatory profile. However, cytokine IL-17 has been examined to better understand the pathophysiology of this disease. Severe asthmatic patients experience frequent exacerbations, leading to infection, and subsequently show altered levels of inflammation that are unlikely to be due to the Th2 immune response alone. This study estimates the effects of anti-IL-17 therapy in the pulmonary parenchyma in a murine asthma model exacerbated by LPS. BALB/c mice were sensitized with intraperitoneal ovalbumin and repeatedly exposed to inhalation with ovalbumin, followed by treatment with or without anti-IL-17. Twenty-four hours prior to the end of the 29-day experimental protocol, the two groups received LPS (0.1 mg/ml intratracheal OVA-LPS and OVA-LPS IL-17). We subsequently evaluated bronchoalveolar lavage fluid, performed a lung tissue morphometric analysis, and measured IL-6 gene expression. OVA-LPS-treated animals treated with anti-IL-17 showed decreased pulmonary inflammation, edema, oxidative stress, and extracellular matrix remodeling compared to the non-treated OVA and OVA-LPS groups ($p < 0.05$). The anti-IL-17 treatment also decreased the numbers of dendritic cells, FOXP3, NF- κ B, and Rho kinase 1- and 2-positive cells compared to the non-treated OVA and OVA-LPS groups ($p < 0.05$). In conclusion, these data suggest that inhibition of IL-17 is a promising therapeutic avenue, even in exacerbated asthmatic patients, and significantly contributes to the control of Th1/Th2/Th17 inflammation, chemokine expression, extracellular matrix remodeling, and oxidative stress in a murine experimental asthma model exacerbated by LPS.

Keywords: anti-IL-17, distal lung, asthma, inflammation, LPS-exacerbated

INTRODUCTION

Bronchial asthma is an inflammatory, obstructive, heterogeneous, complex, and chronic lung disease characterized by an increase in mucus secretion and hyperreactivity of the airways. Over time, functional and structural changes in lung tissue may occur (1). Bronchial asthma is defined based on clinical and pathophysiological characteristics. Patients with a pre-existing diagnosis or even an initial presentation of asthma can have exacerbations (2).

LPS is a glycolipid that is present in the outer membrane of Gram-negative bacteria and is an important activator of the innate immune response *via* toll-like receptor 4. It has little toxicity when used directly to treat cells (*in vitro*). The use of this endotoxin provides information on the effects of the inflammatory response by bacterial infection (3). Starkhammar et al. (4) used an experimental model with a low dose of LPS (0.1 mg/ml) and found increased airway hyperresponsiveness and neutrophil-dominant inflammation, which is common in asthmatic patients with exacerbations caused by bacteria. However, the use of LPS in high doses reproduces a experimental model of acute lung injury (5).

Th17 cells act as potent inducers of inflammatory responses as a determining factor for severe asthma (6). In addition to displaying an elevated anti-inflammatory profile, increased IL-17A and IL-17F levels may aggravate the neutrophil inflammatory response (7). IL-17 promotes eosinophilia in airways through chemokine growth factors (G-CSF, GM-CSF, and TNF- α) (8). In addition, IL-17 may contribute to the remodeling of airways in asthma, suggesting that blockade of this cytokine may facilitate fibrosis control (9). Furthermore, allergic asthma may be influenced by the IL-17 levels, which directly increase smooth muscle cells in airways *via* the NF- κ B signaling pathway. NF- κ B modulates expression of the GTPase RhoA and its effector kinases ROCK-1 and ROCK-2, which are signaling factors that are critical for airway smooth muscle contraction (10). Thus, the NF- κ B, Rho kinase, and IL-17 pathways may be attractive therapeutic targets for the treatment of AHR and inflammation (11).

Although previous studies have demonstrated the role of IL-17 in hyperreactivity (4, 12), few studies have evaluated the effects of LPS in animal models allergic inflammation. Lowe et al. (13) showed the effects of exposure to LPS and OVA in mice treated with corticosteroids. They observed changes in the neutrophils, eosinophils, and functional inflammatory responses, and these effects prolonged asthmatic responses and decreased corticosteroid sensitivity. Bae et al. (14) confirmed that the exacerbations are associated to of neutrophilic responses and increase in IL-17 levels due to LPS treatment in asthma model. However, there are no studies evaluating the chemokines and signaling pathways involved in allergic inflammation exacerbated by LPS. In addition, remodeling of the extracellular matrix and oxidative stress may be potentiated in bacterial infections. Although asthma is considered to be an airway disease, this condition has long been characterized by the contribution of distal parenchymal changes in asthmatic responses, and the development of alterations in the distal lungs of asthmatic patients has an important impact on the pathogenesis and treatment of this disease (15, 16). Thus, the pulmonary parenchyma may play a fundamental role in total pulmonary resistance in addition to its potential participation in the pathophysiology of asthma, which may alter the potential treatment of this disease, particularly in severe asthma (17–19).

We recently demonstrated the presence of hyperresponsiveness, an increase in inflammatory cells, activation of the oxidative stress pathway and remodeling of the extracellular matrix in the distal parenchyma of chronic allergic inflammation models (10, 20).

Although IL-17 shows potential as an alternative for asthma treatment, there are no studies evaluating the use of anti-IL-17 in LPS-exacerbated asthma models. The aim of this study was to

examine the levels of oxidative stress, inflammation, and extracellular remodeling in the lung parenchyma of an animal model of LPS-exacerbated asthma.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Groups

The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo (Case No. 141/16).

This protocol was repeated twice and used a total of 60 animals male BALB/c mice from the Medical School at the University of São Paulo were utilized in accordance with the Guideline to Care and Use of Laboratory Animals, published by the National Institutes of Health (21) (NIH publication 85-23, revised in 1985). On average, the body weight of the animals was approximately 20–25 g at the beginning of the sensitization protocol. The animals were divided into the following groups: the SAL group, which received inhalations with a sterile saline solution ($n = 6$); the OVA group, which received inhalations of an ovalbumin solution ($n = 6$); the OVA anti-IL-17 group, which received inhalations of an OVA solution and treatment with an anti-IL-17 monoclonal antibody ($n = 6$); the OVA-LPS group, which received inhalations of an ovalbumin solution and LPS instillation ($n = 6$); and the OVA-LPS anti-IL-17 group, which received inhalations of an ovalbumin solution, LPS instillation and treatment with an anti-IL-17 monoclonal antibody ($n = 6$).

Sensitization Protocol

A schematic describing the 29-day ovalbumin sensitization protocol used in this study is shown in **Figure 1**. Mice received a solution of 50 μ g of ovalbumin (GRADE IV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 6 mg of aluminum hydroxide (Alumen; Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brazil) in a total volume of 0.2 ml *via* intraperitoneal injection on days 1 and 14. The animals inhaled an OVA aerosol diluted in 0.9% NaCl (physiological saline) at a final concentration of 10 mg/ml (1%) on days 22, 24, 26, and 28. In addition, the SAL group received a saline solution (NaCl 0.9%) and aluminum hydroxide (Alumen) (6 mg) *via* intraperitoneal injection; on the inhalation challenge days, the mice were exposed to 0.9% saline solution through aerosol for 30 min (22). The LPS administration was based on the protocol of Starkhammar et al. (4), who used a dose that only caused hyperresponsiveness and neutrophil recruitment. The treatment was performed with 20 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) + 0.1 mg/ml *Escherichia coli* 0127: B8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 24 h after the last antigen challenge on day 29. The animals in the LPS-OVA and anti-LPS-OVA IL-17 groups were anesthetized *via* inhalation of isoflurane and received LPS intratracheally. No animal died during this protocol.

Treatment

An anti-IL-17A (clone50104) neutralizing antibody (R and D Systems, Abingdon, UK) was administered *via* intraperitoneal injection 1 h prior to each aerosol administration on days 22, 24, 26, and 28 of the experimental asthma protocol and 1 h before

FIGURE 1 | Timeline of the protocol for establishing chronic allergic inflammation + exacerbation. On days 1 and 14, the OVA, OVA-LPS, OVA anti-IL-17, and OVA-LPS anti-IL-17 groups were sensitized with OVA (i.p.) and the SAL control group received saline (i.p.). On days 22, 24, 26, and 28, 1 h prior to inhalation challenge, the treatment groups received anti-IL-17 (i.p.), and 24 h after the end of the protocol, the OVA-LPS and OVA-LPS anti-IL-17 groups received intratracheal LPS.

LPS administration, at a dose of 7.5 µg/application, based on the Barlow's protocol (23).

Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

Animals were anesthetized with thiopental (250 mg/kg i.p.) 24 h after the end of the protocol. The anterior chest wall was opened, animals were exsanguinated *via* the abdominal aorta, and BALF was collected. The trachea was cannulated, and BALF was obtained by washing the airway lumina with 3 × 0.5 ml of sterile saline; for each 0.5 ml instilled, the volume was recovered (totaling 1.5 ml). The BALF sample was centrifuged at 790 g for 10 min at 5°C. The cell pellet was resuspended in 300 µl of saline. Subsequently, after vortex mixing, 100 µl of this sample was used for lamina preparation for differential counting. The remaining BALF was cytocentrifuged in a Cytospin for 6 min at 450 rpm, and the lamina was subsequently stained with *DiffQuick*. The total cell count was obtained by optical microscopy and a *Neubauer* hemocytometer (400× magnification). The differentiation of neutrophils, eosinophils, lymphocytes, and macrophages was performed using an optical microscope with an immersion objective lens (1,000× magnification). At the end of this procedure, the lungs were isolated and removed for histological analysis.

Mean Alveolar Diameter (Lm)

The Lm was measured using a microscope (E200MV, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) with a 400× magnification and a reticulum with a known area (50 straight and 100 points) to calculate how many times the reticular lines intercepted the alveolar walls. The initial area of the alveolar walls was determined, excluding vessels and airways. For each animal, 20 lung parenchyma fields were randomly analyzed. Thus, the mean alveolar diameter was calculated according to the ratio of the area of the pulmonary parenchyma to the number of intersections between

the lines and the alveolar walls. All Lm values were expressed in micrometers (24). We used this method of analysis to rule out any acute lung injury at the dose of LPS used in the present protocol.

Immunohistochemistry

Pulmonary tissue fragments were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Five-micrometer thick sections were stained with hematoxylin and eosin for further analysis. The material was subjected to standard histological techniques as described below. The slices were deparaffinized and rehydrated for immunohistochemistry, treated with Proteinase K for 20 min at 37°C followed by 20 min at room temperature, and washed with PBS. Blocking of endogenous peroxidases was performed by incubation with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) 10 V (3 × 10 min) and sections of experimental and control (positive and negative) tissue slides were incubated overnight with the indicated antibodies (**Figure 2**). The following day, the slides were washed in PBS and incubated with a secondary antibody using ABCKit by Vectastain (Vector Elite-PK-6105 anti-goat), PK-6101 (anti-rabbit), and PK-6102 (anti-mouse). For visualization of positive cells, the slides were washed in PBS and proteins were visualized using 3,3'-diaminobenzidine chromosome (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Slide sections were contrasted with Harris hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) and assembled using Entellan microscopy resin (Merck) (25). Analyzes were performed using the morphometric technique described below.

Morphometric Analysis for Inflammatory and Edema Evaluation

The point-counting technique was employed (26) by means of a reticule of a known area (50 lines and 100 points) coupled to a microscope (E200MV, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Ten

Marker	Dilution	Primary antibody	Specification	Marker	Dilution	Primary antibody	Specification
IL-2	1:250	Anti-rabbit	SC-7896 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	8-iso-PGF2 α	1:1500	Anti-goat	IS-20 Goat Polyclonal; Oxford Biomed. Resear, MI, USA
IL-4	1:150	Anti-goat	SC-1260 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	NFkB	1:150	Anti-rabbit	SC-109 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-5	1:600	Anti-rabbit	SC-7887 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	ROCK2	1:50	Anti-goat	SC-6055 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-6	1:600	Anti-goat	SC-1265 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	ROCK1	1:50	Anti-goat	SC-1851 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-13	1:500	Anti-goat	SC-1776 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	iNOS	1:1600	Anti-mouse	N-32020 Mouse Monoclonal; BD transduction Lab. CA, USA
IL-10	1:50	Anti-mouse	SC-73309 Rat Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	TGF- β	1:600	Anti-rabbit	SC-146 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
IL-17	1:800	Anti-mouse	SC-73309 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	Decorin	1:600	Anti-goat	SC-22613 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
CD4	1:600	Anti-mouse	SC-13573 Rat Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	Actin	1:600	Anti-mouse	SC-22613 Mouse Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
CD8	1:600	Anti-mouse	YTS- 169AG Rat Monoclonal; Thermo Fis. Sci, CA, USA	Fibronectin	1:600	Anti-goat	SC-22613 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
FOXP3	1:1200	Anti-mouse	SC-53876 Mouse Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	Biglycan	1:1200	Anti-goat	SC-27936 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
Cells dendritic**	1:300	Anti-rabbit	SC-87673 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	MMP-9	1:500	Anti-rabbit	SC-6840 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
TARC	1:400	Anti-goat	SC-12271 Goat Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	MMP-12	1:400	Anti-rabbit	SC-30072 Rabbit Polyclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA
TNF- α	1:100	Anti-mouse	SC-52746 Mouse Monoclonal; Sta. Cruz Biotechnology, CA, USA	TIMP-1	1:100	Anti-rabbit	LS-C299465 Mouse Polyclonal; LifeSpan BioScien, Inc, WA, USA
Lumican	1:100	Anti-rabbit	AB-168348 Rabbit Monoclonal; Abcam Biotech. Life Sci, MA, EUA	Fibers Collagen I	1:300	Anti-rabbit	AB-34710 Rabbit Polyclonal; Abcam Biotech. Life Sci, MA, EUA
				Fibers Collagen III	1:600	Anti-rabbit	AB-7778 Rabbit Polyclonal; Abcam Biotech. Life Sci, MA, EUA

FIGURE 2 | Types of antibodies and dilutions used in the study. **This monoclonal antibody is per DC-STAMP that represents a multi-membrane spanning protein preferentially expressed for dendritic cells. DC-STAMP is present in the endoplasmic reticulum of immature DC's and it can translocate to the Golgi compartment during maturation.

random fields in the alveolar walls per animal, at a magnification of 1,000 $\times$, were counted, and the number of positive cells was established based on the number of points that coincided with the positive cells within the reticulum divided by the number of points coinciding with the alveolar walls. The total area of the reticulum was 10⁴ μ m² and analyzes were performed at 1,000 $\times$ magnification (17, 27).

The optical density was used to evaluate the volume fractions of the collagen fibers type I and III, actin, decorin, lumican, biglycan, fibronectin, and isoprostone PGF2 α . Images were captured using an Leica DM2500 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), a digital camera (Leica DFC420 Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The images were acquired and processed using Optimas v.4.10 software. We analyzed 10 fields per lamina and one lamina per animal. The images were analyzed using Image-Proplus 4.5 software (NIH, MD, USA). This software allowed a thresholding of the color shades to be developed. These shades represent the positive areas quantified in the previously determined area. The volume fractions of these markers are expressed as percentages of the area (20).

By using a light microscope (Leica DFC 420 Leica microsystems, Wetzlar, Germany), eight non-overlapping fields of view were imaged at 100 $\times$, 200 $\times$, and 400 $\times$ magnifications. We used a weighted scoring system to quantify interstitial edema. Scores from 0 to 4 were used to represent the severity of interstitial edema, with 0 representing no effect and 4 representing maximal severity.

Additionally, the degree of each score quantified per field of view was established on a scale of 0–4, with 0 representing no noticeable extent and 4 representing complete involvement. An evaluator blind to all animal treatment conditions performed all analyzes and product of severity and the extent of each feature, ranging from 0 to 16, was used to calculate the overall scores (28, 29).

Gene Expression

The expression level of IL-6R in the lungs was evaluated using real-timePCR (polymerase chain reaction) as previously reported by our group (30). Expression of GAPDH was used as an internal control. The primer sequences and annealing temperatures were: GAPDH (5'–3' sense: CCACCACCCTGTTGCTGTAG; 5'–3' antisense: CTTGGGCTACACTGAGGACC; 60°C; NM_008084) and IL-6R (5'–3' sense: TTCTCTGGGAAATCGTGAAA; 5'–3' antisense: TCAGAATTGCCATTGCACAAC; 60°C; NM_001314054). The results were obtained as cycle number at which logarithmic PCR plots cross a calculated threshold line and used to determine Δ Ct values [Δ Ct = (Ct of the target gene) – (Ct of the house-keeping gene)]. The results were expressed as arbitrary units using the transformation: Expression = 1000 $\times$ (2^{– Δ Ct}) arbitrary units.

Statistical Analysis

All data are represented as the means $\pm$ SEs, and graphs are presented in bar formats. One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the *Holm-Sidak* method for multiple comparisons

was used to determine the difference between groups with statistical significance. All analyzes were conducted using SigmaPlot 11.0 software (Systat Software, SPSS Inc., USA). A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Mean Linear Intercept (Lm)

The mean linear values of the alveolar intercepts of the experimental groups were as follows: Group OVA (40.82 ± 1.55),

OVA-LPS (44.40 ± 0.58), and SAL (42.23 ± 0.46), which were not significantly different. The OVA group treated with anti-IL-17 (41.93 ± 0.60) and the OVA-LPS group treated with anti-IL-17 (42.29 ± 0.51) had no significant differences compared to the OVA and OVA-LPS groups.

Effects of Anti-IL-17 on BALF

The total cell count in the BALF and the differential count for macrophages, lymphocytes, neutrophils, and eosinophils are shown in **Figures 3A–E**. The evaluation of the total and the differential cell

FIGURE 3 | Effects of anti IL-17 treatment on bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (A–E). (A) Total cells, (B) cell differential for macrophages, (C) cell differential for neutrophils, (D) cell differential for Lymphocytes, and (E) cell differential for eosinophils. The results are expressed as 10^4 cells/mL. Data are presented as the means $\pm$ SEs. The differences were considered significant when $p < 0.05$. * $p < 0.05$ vs. SAL group; ** $p < 0.05$ vs. OVA and OVA-LPS groups. # $p < 0.05$ vs. OVA group.

counts for macrophages, neutrophils, and eosinophils revealed an increase of type cells in the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group ($p < 0.05$). The OVA-LPS group showed an increase in the number of total cells and neutrophils compared to the OVA group ($p < 0.05$). The animals from the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups showed decreases in the numbers of total cells, macrophages, and neutrophils compared to the OVA and OVA-LPS groups, respectively ($p < 0.05$). However, eosinophils decreased only in the OVA anti-IL-17 group compared to the OVA group ($p < 0.05$). There was no significant difference in the counts of lymphocytes in any of the groups. The following is the description of the cell differences in percentage for: 1. Macrophages: SAL ($8.76 \pm 0.35\%$), OVA ($48.15 \pm 7.94\%$), OVA-anti-IL-17 ($5.57 \pm 0.90\%$), OVA-LPS ($33.78 \pm 3.00\%$), and OVA-LPS anti-IL-17 ($14.29 \pm 7.33\%$) groups; 2. Neutrophils: SAL ($0.20 \pm 0.03\%$), OVA ($0.75 \pm 0.29\%$), OVA-anti-IL-17 ($2.31 \pm 0.43\%$), OVA-LPS ($30.14 \pm 5.72\%$), and OVA-LPS anti-IL-17 ($1.05 \pm 0.32\%$) groups; 3. Lymphocytes: SAL ($0.10 \pm 0.04\%$), OVA ($0.16 \pm 0.04\%$), OVA-anti-IL-17 ($0.24 \pm 0.14\%$), OVA-LPS ($0.40 \pm 0.18\%$), and OVA-LPS-anti-IL-17 ($0.21 \pm 0.12\%$) groups; 4. Eosinophils: SAL ($0.24 \pm 0.0\%$), OVA ($67.14 \pm 31.76\%$), OVA-anti-IL-17 ($1.23 \pm 0.10\%$), OVA-LPS ($28.95 \pm 1.58\%$), and OVA-LPS anti-IL-17 ($8.91 \pm 8.38\%$) groups.

Effect of Anti-IL-17 on Gene and Cell Expression of IL-6

We compared the results of IL-6 gene expression analysis by PCR with the cell expression of this cytokine assessed by morphometric analysis following immunohistochemical staining. The number of positive cells and gene expression of IL-6 in the lung parenchyma is presented in **Figure 4A**. There was an increase in the number of positive cells in the lung parenchyma in the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group ($p < 0.05$). The OVA-LPS group showed an increase in relation to the OVA group ($p < 0.05$). Treatment with anti-IL-17 attenuated all inflammatory markers evaluated in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups compared to the OVA and OVA-LPS groups

($p < 0.05$). The gene expression evaluation by PCR showed similar patterns of responses compared to morphometric analyzes, as shown in **Figure 4B**. Considering these results, we decided to evaluate additional inflammatory, remodeling, and oxidative stress markers using morphometric analysis after immunohistochemistry studies.

Effects of Anti-IL-17 Therapy on Inflammation

The number of cells positive for IL-4, IL-13, IL-17 expression and increased interstitial edema is presented in **Figures 5A–D**. The number of cells positive for IL-2, IL-5, IL-10, TNF- α , TARC, CD4, and CD8 expression in the lung parenchyma is presented in **Table 1** (A). The number of positive cells in the lung parenchyma showed an increase in their contents in the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group ($p < 0.05$). The OVA-LPS group showed an increase in all markers compared to the OVA group, except for TNF- α and IL-17 ($p < 0.05$). Treatment with anti-IL-17 reduced the levels of inflammatory markers evaluated in the OVA anti-IL-17 and the OVA-LPS anti-IL-17 groups compared to the OVA and OVA-LPS groups, respectively ($p < 0.05$). Regarding interstitial edema, an increase was observed in the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group ($p < 0.05$). In the OVA-LPS group, an increase was observed in the level of interstitial edema compared to the OVA group ($p < 0.05$). Treatment with anti-IL-17 in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups decreased the regions of interstitial edema compared to the OVA and OVA-LPS groups ($p < 0.05$).

Effects of Anti-IL-17 on Regulatory T Cells (Treg) and on Antigen-Presenting Cells (APC)

The numbers of FOXP3 (Treg) and Dendritic cells (APC) in the lung parenchyma is presented in **Table 1** (B). There was an increase in the number of positive cells in the lung parenchyma in both the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group

FIGURE 4 | Effects of anti-IL-17 on IL-6 gene expression and IL-6 positive cell number. **(A)** The levels of IL-6 mRNA in the lung parenchyma were evaluated using RT-PCR (AU) and **(B)** IL-6-positive cells. The results were expressed as arbitrary units and as positive cells $10^4 \mu\text{m}^2$. Data represent means $\pm$ SEs. The differences were considered significant when $p < 0.05$. * $p < 0.05$ vs. SAL group; ** $p < 0.05$ vs. OVA and OVA-LPS groups. # $p < 0.05$ vs. OVA group.

TABLE 1 | Absolute values of inflammatory markers, Treg, and antigen-presenting cells in the pulmonary parenchyma.

	SAL	OVA	OVA anti-IL-17	OVA-LPS	OVA-LPS anti-IL-17
(A) Inflammatory markers					
TARC (cells/10 ⁴ μm ²)	1.11 ± 0.25	4.32 ± 0.38*	1.17 ± 0.10**	5.61 ± 0.41*#	1.80 ± 0.38**
CD4 (cells/10 ⁴ μm ²)	1.87 ± 0.16	4.82 ± 0.51*	1.84 ± 0.32**	6.59 ± 0.64*#	2.40 ± 0.37**
CD8 (cells/10 ⁴ μm ²)	0.36 ± 0.11	2.96 ± 0.38*	0.67 ± 0.09**	5.37 ± 0.65*#	1.94 ± 0.30**
IL-2 (cells/10 ⁴ μm ²)	0.92 ± 0.08	3.21 ± 0.16*	1.69 ± 0.18**	5.30 ± 0.27*#	1.94 ± 0.10**
IL-5 (cells/10 ⁴ μm ²)	0.94 ± 0.19	5.20 ± 0.49*	1.74 ± 0.13**	7.36 ± 0.56*#	2.06 ± 0.34**
IL-10 (cells/10 ⁴ μm ²)	0.54 ± 0.09	4.10 ± 0.25*	0.78 ± 0.10**	6.22 ± 0.30*#	1.72 ± 0.18**
TNF-α (cells/10 ⁴ μm ²)	1.18 ± 0.37	5.43 ± 0.54*	1.50 ± 0.34**	3.15 ± 0.62*	1.65 ± 0.49**
(B) Markers Treg and antigen-presenting cell					
Dendritic cells (cells/10 ⁴ μm ²)	0.44 ± 0.10	3.42 ± 0.43*	1.06 ± 0.25**	7.23 ± 0.93*#	2.00 ± 0.26**
FOXP3 (cells/10 ⁴ μm ²)	1.37 ± 0.29	8.78 ± 0.74*	5.77 ± 0.61**	11.30 ± 1.32*#	5.71 ± 0.93**

Inflammatory markers for TARC, CD4, CD8, IL-2, IL-5, IL-10, and TNF-α are presented as positive cells/10⁴ μm², and regulatory T and antigen-presenting cell markers for dendritic cells and FOXP3 are presented as positive cells/10⁴ μm².

* $p < 0.05$ in comparison with the SAL group.

** $p < 0.05$ in comparison with the OVA and OVA-LPS groups.

$p < 0.05$ in comparison with the OVA group.

($p < 0.05$). The OVA-LPS group showed an increase relative to the OVA group ($p < 0.05$). Treatment with anti-IL-17 attenuated all inflammatory markers evaluated in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups compared to the OVA and OVA-LPS groups ($p < 0.05$).

Effects of Anti-IL-17 on Extracellular Matrix Remodeling

The number of cells positive for MMP-9, MMP-12, TIMP-1, and TGF-β, as well as the volume fraction of collagen fibers I and III,

TABLE 2 | Absolute values for remodeling markers in the pulmonary parenchyma.

Remodeling markers	SAL	OVA	OVA anti-IL-17	OVA-LPS	OVA-LPS anti-IL-17
MMP-9 (cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	2.70 $\pm$ 0.46	8.11 $\pm$ 0.47*	2.57 $\pm$ 0.36**	16.50 $\pm$ 0.62* [#]	9.75 $\pm$ 0.43**
MMP-12 (cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	0.32 $\pm$ 0.06	7.51 $\pm$ 0.48*	1.36 $\pm$ 0.26**	11.00 $\pm$ 1.96* [#]	1.62 $\pm$ 0.28**
TIMP-1 (cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1.11 $\pm$ 0.18	8.29 $\pm$ 0.85*	2.72 $\pm$ 0.48**	9.96 $\pm$ 0.95*	3.95 $\pm$ 0.56**
TGF- β (cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	1.65 $\pm$ 0.23	31.60 $\pm$ 2.22*	19.84 $\pm$ 1.53**	42.06 $\pm$ 1.91* [#]	8.35 $\pm$ 0.75**
Collagen Fibers I (%)	12.16 $\pm$ 0.88	22.25 $\pm$ 2.16*	13.58 $\pm$ 1.12**	25.19 $\pm$ 1.48	20.08 $\pm$ 0.72**
Collagen Fibers III (%)	0.89 $\pm$ 0.09	13.47 $\pm$ 0.62*	8.17 $\pm$ 0.53**	20.10 $\pm$ 0.80* [#]	7.89 $\pm$ 0.71**
Decorin (%)	1.62 $\pm$ 0.29	52.68 $\pm$ 2.60*	2.77 $\pm$ 0.43**	55.66 $\pm$ 2.37*	8.00 $\pm$ 0.92**
Lumican (%)	14.03 $\pm$ 0.18	27.39 $\pm$ 1.02*	21.64 $\pm$ 1.47**	26.57 $\pm$ 0.68*	15.33 $\pm$ 0.54**
Actin (%)	8.05 $\pm$ 1.84	28.44 $\pm$ 1.99*	12.80 $\pm$ 1.29**	29.90 $\pm$ 1.93*	6.9 $\pm$ 1.66**
Biglycan (%)	4.13 $\pm$ 0.23	12.47 $\pm$ 0.71*	5.39 $\pm$ 1.08**	20.68 $\pm$ 2.83* [#]	5.00 $\pm$ 0.66**
Fibronectin (%)	4.60 $\pm$ 0.47	40.27 $\pm$ 1.65*	11.17 $\pm$ 1.06**	48.56 $\pm$ 2.03* [#]	10.20 $\pm$ 0.78**

Remodeling markers for MMP-9, MMP-12, TIMP-1, and TGF- β are expressed as positive cells/ $10^4 \mu\text{m}^2$. Collagen fibers I and II, decorin, lumican, actin, biglycan, and fibronectin are presented as volume fraction expressed as percentages of area (%).

* $p < 0.05$ in comparison with the SAL group.

** $p < 0.05$ in comparison with the OVA and OVA-LPS groups.

[#] $p < 0.05$ in comparison with the OVA group.

decorin, actin, biglycan, lumican, and fibronectin in the lung parenchyma, is presented in **Table 2**. All markers were increased in the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group ($p < 0.05$). The OVA-LPS group showed an increase in the volume fraction of biglycan, fibronectin, and collagen fibers I and III compared to the OVA group ($p < 0.05$). The numbers of cells positive for MMP-9, MMP-12, and TGF- β were increased compared to the OVA group ($p < 0.05$). There was no increase in the lumican, actin and decorin levels in OVA-LPS animals compared to OVA animals. There was a decrease in all markers in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups compared to non-treated animals (OVA and OVA-LPS groups, respectively, $p < 0.05$).

Effects of Anti-IL-17 on Oxidative Stress

The numbers of cells positive for iNOS and the volume fractions of PGF-2- α isoprostane in the lung parenchyma are shown in **Figures 6A,B**. Both markers in the OVA and OVA-LPS groups were increased compared to the SAL group ($p < 0.05$). There was an increase in the OVA-LPS group in the number of cells positive

for iNOS and the volume fraction of PGF-2- α isoprostane compared to the OVA group ($p < 0.05$). Treatment with anti-IL-17 attenuated these markers in OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups compared to the OVA and OVA-LPS groups ($p < 0.05$).

Effects of Anti-IL-17 on Signaling Pathways

The cellular expression levels of NF- κ B, ROCK-1, and ROCK-2 in the lung parenchyma are shown in **Figures 7A–C**. We observed an increase in the numbers of cells positive for these markers in the OVA and OVA-LPS groups compared to the SAL group ($p < 0.05$). There was an increase in the OVA-LPS group in the number of positive cells for ROCK-1 and ROCK-2 compared to the OVA group ($p < 0.05$). In the OVA-LPS group, there was no increase in the number of NF- κ B-positive cells. Anti-IL-17 treatment in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 group ameliorated all increases in these markers

compared to the OVA and OVA-LPS groups, respectively ($p < 0.05$).

Effects of IL-17 Inhibition Through Qualitative Analysis

Photomicrographs of extracellular matrix inflammatory features of alveolar walls measuring IL-4, IL-13 and IL-17 are shown in **Figure 8**. The animals exposed to only ovalbumin and ovalbumin more LPS (OVA and OVA-LPS groups) presented prominent increases in the numbers of positive cells, compared with the control animals (SAL group). Anti-IL-17 treatment in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 group ameliorated all increases in these markers.

Photomicrographs of extracellular matrix remodeling features in the alveolar walls: collagen fibers I and metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) is presented in **Figure 9**. The animals treated with ovalbumin and LPS (OVA, OVA-LPS group) presented increases in volume fraction and number of positive cells compared to the control group (SAL). There was a decrease in all markers in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups compared to non-treated animals.

Photomicrographs of immunohistochemical analysis of oxidative stress and signaling pathways markers present in the alveolar walls, as represented by NF-κB and 8-iso-PGF2α are shown in

Figure 10. There was an increase in the number of cells positive for iNOS and the volume fraction of PGF-2α iso-prostane in the OVA and OVA-LPS non-treated groups compared to the SAL group. Anti-IL-17 treatment in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 group ameliorated all increases in these markers.

DISCUSSION

We evaluated the effects of inhibition of IL-17 in the present study, using an anti-IL-17 monoclonal antibody, on distal pulmonary parenchyma responses characterized by the infiltration of inflammatory cells, differential release of cytokines and chemokines, oxidative stress, extracellular matrix remodeling, signaling pathways, and IL-6 gene expression in an experimental model of LPS-exacerbated asthma. An attenuation of the inflammatory responses of Th1, Th2, and Th17 cytokines, Treg cells and APCs in both the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups was observed, as represented by reductions in the total numbers of inflammatory cells, macrophages, neutrophils, and eosinophils in the BALF. However, did not there was difference in the numbers of lymphocytes, which we considered that was already expected, since these cells are mainly attached to the airway walls and to the alveolar septum. Several studies showed a low number of lymphocytes compared to eosinophils in BALF in asthma animal

FIGURE 8 | Inflammatory markers. Photomicrographs of extracellular matrix inflammatory features of alveolar walls measuring IL-4, IL-13, and IL-17. The red arrows indicate positive cells for IL-4, IL-13, and IL-17. All images are presented at a magnification of 1,000x, scale bars = 10 μ m. The experimental groups are represented as: SAL, OVA, OVA anti-IL-17, OVA-LPS, and OVA-LPS anti-IL-17.

FIGURE 9 | Remodeling markers. Photomicrographs of extracellular matrix remodeling features in the alveolar walls: collagen fibers I and metalloproteinase inhibitor (TIMP-1). The red arrows indicate the collagen fibers and positive cells for TIMP-1. All images are presented at a magnification of 1,000x, scale bars = 10 μ m. The experimental groups are represented as: SAL, OVA, OVA anti-IL-17, OVA-LPS, and OVA-LPS anti-IL-17.

models and in asthmatics (2, 31–33). The anti-IL-17 treatment also decreased the markers of extracellular matrix remodeling, reduction in the volume fraction of actin, biglycan, collagen fibers I and III, decorin, lumican and fibronectin, as well as the cellular expression levels of MMP-9, MMP-12, TIMP-1, and TGF- β . Consistently, a decrease in the numbers of cells positive for

iNOS and activation of PGF-2- α isoprostane in OVA-anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups and similarly, in the signaling pathways mediated by Rho kinases 1 and 2 and NF- κ B.

The experimental model utilized here comprised two distinct phases. In the first stage, we induced allergic inflammation through repeated exposures to ovalbumin. At the second stage,

FIGURE 10 | Oxidative stress and Signaling Pathway markers. Photomicrographs of immunohistochemical analyzes of oxidative stress and signaling pathways markers present in the alveolar walls, as represented by NF- κ B and 8-iso-PGF2 α . The red arrows indicate positive cells for NF- κ B and positive area of 8-iso-PGF2 α . All images were analyzed at a magnification of 1,000x, scale bars = 10 μ m. Experimental groups are represented as: SAL, OVA, OVA anti-IL-17, OVA-LPS, and OVA-LPS anti-IL-17.

our objective was to study an exacerbated asthma model, using a low dose of LPS as previously described (4). We did not consider that this low doses of LPS (0.01 mg/ml) cause acute lung injury based on previous studies in which ALI was induced by doses of LPS at about 50–100 times greater (34, 35). Fodor et al. (35) used increasing doses of LPS (3, 5, and 10 mg/kg) in order to quantify the severity of the dose-dependent effect. They concluded that the findings confirmed sepsis and alveolar–capillary membrane damage in a dose-dependent manner. However, comparing with our work the dose of 3 mg/kg (adjusted to mg per animal) was equivalent to 130 times greater than the one used in our protocol. Reinforcing our hypothesis and in order to rule out the possibility of alveolar damage by this low dose of LPS, we performed the evaluation of alveolar mean (LM) interception (36). LM is an index through which we evaluate the mean diameter of the distal air spaces in order to prove alveolar destruction. We observed that there were no significant differences among all groups.

In previous studies, we demonstrated that this experimental model of allergic inflammation induced by repeated exposures of antigen showed several characteristics present in the pathophysiology of asthma, such as intense constriction, eosinophilic inflammation, oxidative stress, and remodeling of the extracellular matrix in the distal parenchyma (17, 20, 25, 37–39). Concerning the increase of Th1/Th2 and Th17 cytokines observed in the present study, increased levels of CD4+ and CD8+ cells activate immune responses in both humans and experimental mammalian models. Since CD4+ is considered a marker for Th17 cells (40–42), Wang and Wills-Karp (43) demonstrated that the CD4+/Th2 cells induced inflammation during the chronic phase and these cells produce IL-17.

The number of IL-4 and IL-13 positive cells was higher than that observed in the number of IL-17 positive cells. This increase may be related to an effect of another cytokine. One possibility is the IL-6, since this cytokine has emerged as a regulator of CD4 responses and may induce Th1 and Th2 responses (44). Corroborating with these findings, Diehl et al. (45) showed that IL-6 promotes the production of IL-4 and IL-13 in animal models of asthma. We observed a potentiation of IL-6 in the OVA-LPS group in the same way as IL-4 and IL-13. To confirm the importance of IL-6 as the involved mechanism, we checked these data by PCR and immunohistochemistry. Corroborating with our findings, Bae et al. (14) showed in knockout animals for IL-17A a decrease of neutrophils, IL-6, and IL-17. Nevertheless, IL-13 and IL-17 inhibition protected the animals from eosinophilia, mucus hyperplasia, and hyperresponsiveness of the airways and the elimination of neutrophilic inflammation, suggesting the effectiveness of combination therapies that control both Th2 and Th17 responses (46). Herein, we demonstrated that anti-IL-17 treatment attenuated IL-4, IL-5, and IL-13-positive cell responses in the lung parenchyma in the OVA anti-IL-17 and OVA-LPS anti-IL-17 groups.

The function of Foxp3 is to differentiate and expand Treg cells and is a specific marker for this differentiation (47, 48). After Tregs are activated, they express high levels of TGF- β and IL-10, which play an anti-inflammatory role (49). It is known that in mice, TGF- β and IL-6 cytokines are essential for the differentiation of Th17 cells. Inducing the production of IL-17A and IL-17F (50). In addition, Chakir et al. (51) showed a positive correlation between the severity of the disease and Th17 phenotype in patients with moderate and severe asthma.

Concerning alterations in remodeling of the extracellular matrix in the distal parenchyma, an increase in MMP-9-, MMP-12-, TIMP-1-, TGF- β -positive cells and collagen fibers I and III, decorin, lumican, actin, biglycan, and fibronectin volume fraction in the OVA group compared to SAL. Treatment with anti-IL-17 in the OVA and OVA-LPS animals reduced these responses. It was observed in the OVA-LPS group an increase in the responses of MMP-9, MMP-12, TGF- β , fibronectin, and biglycan.

However, the following markers TIMP-1, decorin, lumican, and actin did not differ between OVA and OVA-LPS group. It had been previously shown that LPS in cell cultures an increase in decorin (RNA protein) after 24 h. Nonetheless, the major effect was at 48 h (52). We used only one dose of anti-IL17 after LPS administration. One possible explanation is that only one dose was not sufficient to control the stimuli for decorin production induced by LPS. Analyzing lumican responses, we observed that OVA and OVA-LPS groups were not different. However, anti-IL-17 contributed for a greater reduction of lumican in these groups. Since we observed the same response in the TGF- β assessment, we hypothesized that the reduction of TGF- β by anti IL-17 contributed to the effects observed in the lumican response. These data are in accordance with Krishnan et al. (53), which showed that TGF- β increases lumican expression. In relation to actin, the anti-IL-17 treatment showed a tendency to decrease actin in the OVA-LPS anti IL-17 group. Qin et al. (54) showed that TGF- β was also able to increase actin expression in allergic inflammation models.

In the current study, we found that anti-IL-17 therapy neutralized the remodeling of the lung parenchyma, and we quantified the volume fraction of collagen fibers I and III. We observed that anti-IL-17 treatment mitigated the deposition of collagen fibers in the ECM. These results suggest that anti-IL-17 therapy not only controls inflammation but also remodeling process.

The results of the present study showed a high number of cells positive for MMP-9 and MMP-12 in the OVA-LPS group. Several inflammatory cytokines, such as TNF- α and the antigenic agent LPS, stimulate the synthesis of MMPs in neutrophils (55), and LPS stimulates neutrophil recruitment (56, 57). Oshita et al. (58) had shown that MMP-9 and MMP-12 represent markers of inflammation and remodeling. In addition to the remodeling process, these MMPs also participate in the inflammatory process through the modulation of signaling Th2 cells or through the regulation of leukocyte infiltration in the tissues of the distal parenchyma (59).

Moreover, the reduction of oxidative stress and signaling pathways in response to treatment with anti-IL-17 may have contributed to the reduction of ECM remodeling. We observed an increase in the volume fraction of PGF2- α , iNOS and cells positive for ROCK-1, ROCK-2, and NF- κ B. These markers were reduced after treatment with anti-IL-17.

Righetti et al. (20) and Possa et al. (25) showed that inhibition of ROCK-1 and ROCK-2 contributes to the reduction of eosinophilic recruitment, hyperresponsiveness, and markers of the remodeling process in an asthma model. These findings had positive correlations with the functional responses and the markers of inflammation and remodeling. These studies corroborate our results, suggesting that anti-IL-17 was able to counteract this signaling pathway.

Consistent with these results, Prado et al. (60) demonstrated that treatment with an iNOS inhibitor reduced MMP-9, TIMP-1, and TGF- β levels in the airways in an asthma model. These mediators modulate the production of the collagen and elastic fibers, contributing to the remodeling of the ECM. Starling et al. (37) also showed a significant reduction of PGF2- α isoprostane in animals sensitized with ovalbumin and treated with specific iNOS inhibitors.

Transcription factors are involved in all these processes, including NF- κ B, which is considered a critical modulator of inflammation in the pathogenesis of lung diseases (61). In an attempt to determine the importance of NF- κ B during sensitization to the antigen in the murine asthma model, Pantano et al. (62) demonstrated that the epithelial activation of NF- κ B promoted neutrophilia and eosinophilia and increased the levels of IL-17 and IL-4. Notably, the activation of this pathway might also increase the levels of NOS and arginase (38, 63).

Our study has certain limitations. We used a monoclonal antibody to IL-17 in an experimental animal model, and we cannot directly extrapolate these findings to those expected in humans, although there are several ongoing clinical tests for severe asthmatic patients. Regarding the remodeling process, we evaluated the alterations immediately after the end of the protocol. It would be interesting to evaluate if these alterations were maintained after weeks or months of the end of the experiment. In addition, the confirmation of all alterations observed by immunohistochemistry, using another methodology, such as ELISA could be performed in future studies. In the present one, we did it only for IL-6 considering the regulatory importance of this cytokine on CD4 responses, as previously discussed. However, our study has many strengths since we showed the importance of investigating the Th17 profile in chronic allergic inflammation exacerbated by LPS. We demonstrated a potential of anti-IL17 to attenuate and/or control inflammatory responses, airway remodeling, oxidative stress pathways, as well as the mechanisms involved in the activation of NF- κ B and ROCK-1 and 2 in the lungs with allergic inflammation even though there was a second inflammatory stimulus induced by the exacerbation. Further studies should, therefore, be performed to reveal other pathways that lead to these changes.

CONCLUSION

In this study, it was demonstrated that inhibition of IL-17 contributes to the control of Th1/Th2/Th17-mediated inflammation, Treg cells, APCs, chemokine expression, extracellular matrix remodeling, and oxidative stress in the lung parenchyma in a model of chronic allergic inflammation exacerbated by LPS. This treatment represents a promising therapeutic strategy, although further studies are necessary.

ETHICS STATEMENT

The present study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo (Case No. 141/16). This protocol was repeated twice and used a total of 60 animals male BALB/c mice from the Medical School at the University of São Paulo

were utilized in accordance with the Guideline to Care and Use of Laboratory Animals, published by the National Institutes of Health (NIH publication 85-23, revised in 1985). On average, the body weight of the animals was approximately 20–25 g at the beginning of the sensitization protocol.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IT, MM, RR, and LC conceived the study. LC, RR, LA, TS, and FS performed the experiments. LC, RR, LA, TS, FS, and SF analyzed

the data. IT, RR, MM, CP, MC, MA-V and BS-R contributed reagents/materials/analysis tools. IT, RR, EL, and LC wrote the paper.

FUNDING

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant 2013/17944-1 the National Council of Scientific and the Technological Development (CNPq), and Laboratory of Medical Investigations (LIM-20 FMUSP) for their financial support.

REFERENCES

- Dougherty R, Fahy JV. Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy* (2009) 39(2):193–202. doi:10.1111/j.1365-2222.2008.03157.x
- GINA. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Global Initiative for Asthma (GINA) (2015). Available from: <http://www.ginaasthma.org>
- Petroni RC, Biselli PJ, de Lima TM, Theobaldo MC, Caldini ET, Pimentel RN, et al. Hypertonic saline (NaCl 7.5%) reduces LPS-induced acute lung injury in rats. *Inflammation* (2015) 38(6):2026–35. doi:10.1007/s10753-015-0183-4
- Starkhammar M, Kumlien Georén S, Swedin L, Dahlén SE, Adner M, Cardell LO. Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways. *PLoS One* (2012) 7(2):e32110. doi:10.1371/journal.pone.0032110
- Venancio TM, Machado RM, Castoldi A, Amano MT, Nunes VS, Quintao ECR, et al. CETP lowers TLR4 expression which attenuates the inflammatory response induced by LPS and polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* (2016) 2016:1784014. doi:10.1155/2016/1784014
- Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Bérubé J, Olivenstein R, et al. IL-17 promotes MAPK dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol* (2010) 184(8):4531–7. doi:10.4049/jimmunol.0903162
- Fajt ML, Wenzel SE. Development of new therapies for severe asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* (2016) 9(1):3–14. doi:10.4168/aa.2017.9.1.3
- Zhao Y, Yang J, Gao YD. Altered expressions of helper T cell (Th)1, Th2, and Th17 cytokines in CD8(+) and $\gamma\delta$ T cells in patients with allergic asthma. *J Asthma* (2011) 48(5):429–36. doi:10.3109/02770903.2011.570403
- Al-Muhsen S, Letuve S, Vazquez-Tello A, Pureza MA, Al-Jahdali H, Bahammam AS. Th17 cytokines induce profibrotic cytokines release from human eosinophils. *Respir Res* (2013) 14:34. doi:10.1186/1465-9921-14-34
- Pigati PA, Righetti RF, Possa SS, Romanholo BS, Rodrigues AP, dos Santos AS, et al. 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. doi:10.1186/s12890-015-0073-4
- Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et al. IL-17A produced by ab T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med* (2012) 18(4):547–54. doi:10.1038/nm.2684
- Willis CR, Siegel L, Leith A, Mohn D, Escobar S, Wannberg S, et al. IL-17RA signaling in airway inflammation and bronchial hyperreactivity in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2015) 53(6):810–21. doi:10.1165/rcmb.2015-0038OC
- Lowe AP, Thomas RS, Nials AT, Kidd EJ, Broadley KJ, Ford WR. LPS exacerbates functional and inflammatory responses to ovalbumin and decreases sensitivity to inhaled fluticasone propionate in a guinea pig model of asthma. *Br J Pharmacol* (2015) 172(10):2588–603. doi:10.1111/bph.13080
- Bae JS, Kim JH, Kim EH, Mo JH. The role of IL-17 in a lipopolysaccharide-induced rhinitis model. *Allergy Asthma Immunol Res* (2017) 9(2):169–76. doi:10.4168/aa.2017.9.2.169
- Dolhnikoff M, da Silva LF, de Araujo BB, Gomes HA, Fernezlian S, Mulder A, et al. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 123(5):1090–7, 1097.e1. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.032
- Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. *Chest* (2003) 123(3 Suppl):348S–55S. doi:10.1378/chest.123.3_suppl.348S
- Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2008) 294(6):L1197–205. doi:10.1152/ajplung.00199.2007
- 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. doi:10.1164/rccm.200209-1030OC
- Mauad T, Ferreira DS, Costa MB, Araujo BB, Silva LF, Martins MA, et al. Characterization of autopsy-proven fatal asthma patients in São Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* (2008) 23(6):418–23. doi:10.1590/S1020-49892008000600007
- Righetti RF, Pigati PA, Possa SS, Habrum FC, Xisto DG, Antunes MA, et al. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol* (2014) 192:134–46. doi:10.1016/j.resp.2013.12.012
- National Institutes of Health. *Health Research Extension Act of 1985, Public Law 99-158, November 20, 1985. "Animals in Research" U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*. (1985). Available from: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm#USGovPrinciples>
- Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, et al. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicol Pathol* (2008) 36(5):680–6. doi:10.1177/0192623308317427
- Barlow JL, Flynn RJ, Ballantyne SJ, McKenzie AN. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. *Clin Exp Allergy* (2011) 41(10):1447–55. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03806.x
- Margraf LR, Tomashefski JF Jr, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* (1991) 143(2):391–400. doi:10.1164/ajrccm/143.2.391
- Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2012) 303(11):L939–52. doi:10.1152/ajplung.00034.2012
- Rocco PR, Momesso DP, Figueira RC, Ferreira HC, Cadete RA, Légora-Machado A, et al. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J* (2003) 22(1):20–7. doi:10.1183/09031936.03.00108603
- Nakashima AS, Prado CM, Lancas T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, et al. Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. *J Appl Physiol* (2008) 104(6):1778–85. doi:10.1152/japplphysiol.00830.2007
- Kiss T, Silva PL, Huhle R, Moraes L, Santos RS, Felix NS, et al. Comparison of different degrees of variability in tidal volume to prevent deterioration of respiratory system elastance in experimental acute lung inflammation. *Br J Anaesth* (2016) 116(5):708–15. doi:10.1093/bja/aew093
- Santos CL, Santos RS, Moraes L, Samary CS, Felix NS, Silva JD, et al. Effects of pressure support and pressure-controlled ventilation on lung damage in a model of mild extrapulmonary acute lung injury with intra-abdominal

- hypertension. *PLoS One* (2017) 12(5):e0178207. doi:10.1371/journal.pone.0178207
30. Pinheiro NM, Miranda CJ, Perini A, Câmara NO, Costa SK, Alonso-Vale MI, et al. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. *PLoS One* (2015) 10(3):e0120441. doi:10.1371/journal.pone.0120441
 31. Seitzman GD, Sonstein J, Kim S, Choy W, Curtis JL. Lung lymphocytes proliferate minimally in the murine pulmonary immune response to intratracheal sheep erythrocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1998) 18(6):800–12. doi:10.1165/ajrcmb.18.6.3063
 32. Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, et al. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* (1997) 155(5):1739–47. doi:10.1164/ajrcm.155.5.9154886
 33. Murakami D, Yamada H, Yajima T, Masuda A, Komune S, Yoshikai Y, et al. Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. *Clin Exp Allergy* (2007) 37(3):339–47. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02633.x
 34. Abdelmageed ME, El-Awady MS, Abdelrahim M, Suddek GM. LPS-RS attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves NF- κ B inhibition. *Can J Physiol Pharmacol* (2015) 94(2):140–6. doi:10.1139/cjpp-2015-0219
 35. Fodor RŞ, Georgescu AM, Cioc AD, Grigorescu BL, Cotoi OS, Fodor P, et al. Time- and dose-dependent severity of lung injury in a rat model of sepsis. *Rom J Morphol Embryol* (2015) 56(4):1329–37.
 36. Menden HL, Xia S, Mabry SM, Navarro A, Nyp ME, Sampath V. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 regulates LPS-induced inflammation and alveolar remodeling in the developing lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2016) 55(6):767–78. doi:10.1165/rcmb.2016-0006OC
 37. Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol* (2009) 165(2–3):185–94. doi:10.1016/j.resp.2008.11.011
 38. Aristóteles LR, Righetti RF, Pinheiro NM, Franco RB, Starling CM, da Silva JC, et al. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. *BMC Pulm Med* (2013) 13:52. doi:10.1186/1471-2466-13-52
 39. Sakoda CP, de Toledo AC, Perini A, Pinheiro NM, Hiyane MI, Grecco Sdos S, et al. Sakuranetin reverses vascular peribronchial and lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic pulmonary inflammation. *Acta Histochem* (2016) 118(6):615–24. doi:10.1016/j.acthis.2016.07.001
 40. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* (2008) 454(7203):445–54. doi:10.1038/nature07204
 41. Taher YA, Henricks PA, Oosterhout AJ. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement. *Libyan J Med* (2010) 5(1):5303. doi:10.3402/ljm.v5i0.5303
 42. Newcomb DC, Peebles RS Jr. Th17-mediated inflammation in asthma. *Curr Opin Immunol* (2013) 25(6):755–60. doi:10.1016/j.coi.2013.08.002
 43. Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* (2011) 11(5):388–94. doi:10.1007/s11882-011-0210-y
 44. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci* (2012) 8(9):1281–90. doi:10.7150/ijbs.4874
 45. Diehl S, Chow CW, Weiss L, Palmethofer A, Twardzik T, Rounds L, et al. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J Exp Med* (2002) 196(1):39–49. doi:10.1084/jem.20020026
 46. Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* (2008) 178(10):1023–32. doi:10.1164/rccm.200801-086OC
 47. Pyzik M, Piccirillo CA. TGF- β 1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4⁺ T cell subsets. *J Leukoc Biol* (2007) 82:335–46. doi:10.1189/jlb.1006644
 48. Palomares O, Ruckert B, Jartti T, Kucuksezer UC, Puhakka T, Gomez E, et al. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3⁺ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129:510–20. doi:10.1016/j.jaci.2011.09.031
 49. Durrant DM, Metzger DW. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma. *Immunol Invest* (2010) 39(4–5):526–49. doi:10.3109/08820131003615498
 50. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:485–517. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710
 51. Chakir J, Shannon J, Molet SS, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* (2003) 111(6):1293–8. doi:10.1067/mai.2003.1557
 52. He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Wang H, Zhang J, et al. Lipopolysaccharide enhances decorin expression through the Toll-like receptor 4, myeloid differentiating factor 88, nuclear factor- κ B, and mitogen-activated protein kinase pathways in odontoblast cells. *J Endod* (2012) 38(4):464–9. doi:10.1016/j.joen.2011.12.021
 53. Krishnan A, Li X, Kao WY, Viker K, Butters K, Masuoka H, et al. Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Lab Invest* (2012) 92(12):1712–25. doi:10.1038/labinvest.2012.121
 54. Qin XJ, Zhang GS, Zhang X, Qiu ZW, Wang PL, Li YW, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP2 regulates TGF- β 1 production in airway epithelia and asthmatic airway remodeling in mice. *Allergy* (2012) 67(12):1547–56. doi:10.1111/all.12048
 55. Overbeek SA, Braber S, Koelink PJ, Henricks PA, Mortaz E, LoTam Loi AT, et al. Cigarette smoke-induced collagen destruction; key to chronic neutrophilic airway inflammation? *PLoS One* (2013) 8(1):e55612. doi:10.1371/journal.pone.0055612
 56. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* (2006) 24(2):179–89. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001
 57. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* (2007) 8(9):950–7. doi:10.1038/ni1497
 58. Oshita Y, Koga T, Kamimura T, Matsuo K, Rikimaru T, Aizawa H. Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. *Thorax* (2003) 58(9):757–60. doi:10.1136/thorax.58.9.757
 59. Ingram JL, Kraft M. Metalloproteinases as modulators of allergic asthma: therapeutic perspectives. *Metalloproteinases Med* (2015) 2:61–74. doi:10.2147/MN.M.S63614
 60. Prado CM, Yano L, Rocha G, Starling CM, Capelozzi VL, Leick-Maldonado EA, et al. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* (2011) 37(5):259–68. doi:10.3109/01902148.2010.538289
 61. Gosens R, Schaafsma D, Bromhaar MMG, Vrugt B, Zaagsma J, Meurs H, et al. Growth factor-induced contraction of human bronchial smooth muscle is Rho-kinase-dependent. *Eur J Pharmacol* (2004) 494(1):73–6. doi:10.1016/j.ejphar.2004.04.035
 62. Pantano C, Ather JL, Alcorn JF, Poynter ME, Brown AL, Guala AS, et al. Nuclear factor- κ B activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* (2008) 177(9):959–69. doi:10.1164/rccm.200707-1096OC
 63. Ckless K, Vliet A, Janssen-Heininger Y. Oxidative-nitrosative stress and post-translational protein modifications: implications to lung structure-function relations. Arginase modulates NF- κ B activity via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2007) 36(6):645–53. doi:10.1165/rcmb.2006-0329SM

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Camargo, Righetti, Aristóteles, dos Santos, de Souza, Fukuzaki, Cruz, Alonso-Vale, Saraiva-Romanholo, Prado, Martins, Leick and Tibério. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.