Renato Fraga Righetti

Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica: modulação da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas inflamatórias, da matriz extracelular e do estresse oxidativo no parênquima pulmonar

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

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora

Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério

São Paulo
2012

Renato Fraga Righetti

**Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com
inflamação pulmonar alérgica crônica: modulação
da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas
inflamatórias, da matriz extracelular e do estresse oxidativo
no parênquima pulmonar**

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

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

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

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Righetti, Renato Fraga

Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica : modulação da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas inflamatórias, da matriz extracelular e do estresse oxidativo no parênquima pulmonar / Renato Fraga Righetti. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--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.Inflamação pulmonar 2.Quinases associadas a rho 3.Asma
4.Cobaias

USP/FM/DBD-356/12

DEDICATÓRIA |

*Aos meus pais Attilio Righetti Filho e Silvana Aparecida Fraga Righetti
e meus avós Antônio Carlos Chagas Fraga e Therezinha Maria de Castilho,
que apesar das dificuldades sempre me incentivaram
a prosseguir nos estudos.*

AGRADECIMENTOS |

À minha orientadora Profa. Dra. Iolanda F. L. C. Tibério por sempre acreditar em mim, pelas ajudas, sugestões e amizade. Pelas lições de humildade como pesquisadora, orientadora e acima de tudo como pessoa. Sempre dividindo os seus conhecimentos de forma clara e esperançosa. Meu sincero e eterno agradecimento.

Ao meu grande amigo Marlon Rubio Longo, companheiro de todos os momentos, pessoa que revisou com enorme cuidado as várias versões deste texto, sua ajuda foi fundamental na estruturação deste trabalho. Obrigado pela grande amizade.

À minha grande amiga Patrícia Angeli da Silva Pigati, obrigado por tornar todos os momentos estressantes durante o doutorado em momentos inesquecíveis e de muita diversão. Impossível descrever toda a minha gratidão, mas posso dizer que formamos uma ótima dupla.

Às minhas chefas Claudia Kondo e Ana Lígia do Hospital Sírion Libanês que me ajudaram cedendo as folgas e flexibilidade de horário no hospital para a realização dos experimentos e participações em congressos. Obrigado pela paciência.

À Profa. Patrícia Rocco, Débora Xisto e Mariana Antunes por disponibilizarem e ensinarem a micromecânica no laboratório de fisiologia respiratória da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À Carla Máximo Prado e Edna Leick, pelo exemplo em pesquisa. Carla com o seu raciocínio rápido e a Edninha com a sua paciência e perfeccionismo. São exemplos de que conhecimento e humildade podem caminhar juntos.

À equipe de pesquisadores e alunos do LIM-20: Beatriz Saraiva, Fernanda Lopes, Adenir Perini, Fernanda Arantes, Clarice Olivo, Samantha Possa e Rafael Reis pelas colaborações diretas e indiretas neste estudo.

À Viviane Ruiz que me apresentou a família LIM-20, sua confiança em minha capacidade foi o gatilho para toda esta jornada.

Às minhas amigas: Kátia Shu, Yolanda Souza, Karla Borges, Flávia Politi, Marcela Cavalcanti e Adriana Palmeira pelo estímulo e amizade.

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

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

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

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

	Lista de abreviaturas e Siglas	
--	--------------------------------	--

	Resumo	
	Summary	

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Asma Brônquica	2
1.1.1	Definição	2
1.1.2	Epidemiologia	4
1.1.3	Fisiopatogenia da Asma	7
1.1.3.1	Citocinas Inflamatórias na Asma	10
1.1.3.2	Remodelamento	13
1.1.3.3	Óxido Nítrico, estresse oxidativo e isoprostanos	21
1.1.3.4	Importância do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma	28
1.1.4	Modelos experimentais de asma	31
1.2	Rho Quinase	35
1.2.1	Inibidores da Rho quinase	36
1.2.2	Rho Quinase e a asma	38
1.3	Justificativas do estudo	46
2.	OBJETIVOS	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Animais	50
3.2	Grupos Experimentais	50
3.3	Indução da Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica	51
3.4	Tratamento com Y-27632	52
3.5	Avaliação da Mecânica oscilatória do tecido pulmonar	53

3.6	Estudos Morfométricos	56
3.6.1	Quantificação de fibras colágenas e elásticas	58
3.6.2	Quantificação de eosinófilos no tecido	58
3.6.3	Avaliação expressão celular de citocinas	59
3.6.4	Avaliação da expressão celular de iNOS	60
3.6.5	Avaliação da expressão tecidual de 8-isoprostano-PGF2 α	61
3.6.6	Avaliação da Expressão Celular de NF- κ B	62
3.6.7	Avaliação da expressão tecidual de actina	63
3.6.8	Avaliação da expressão celular de MMP-9	64
3.6.9	Avaliação da expressão celular de TIMP-1	65
3.6.10	Avaliação da expressão celular de TGF- β	66
3.7	Anafilaxia cutânea passiva (ACP)	67
3.8	Análise estatística	68
4.	RESULTADOS	69
4.1	Avaliação da mecânica do parênquima pulmonar	70
4.2	Análises morfométrica	71
4.3	Análise de correlação	86
4.4	Efeitos na anafilaxia cutânea passiva	88
5.	DISCUSSÃO	89
6.	CONCLUSÕES	103
7.	REFERÊNCIAS	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina bovina sérica
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
CD	Célula dendrítica
CLM	Cadeia leve da miosina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacylglicerol
EAR	Resposta alérgica imediata
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase derivada do endotélio
Et	Elastância tecidual
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GAPs	proteínas ativadoras de GTPases
GDI	Inibidores de dissociação de GTPase
GDP	Guanina difosfato
GEFs	Fatores de troca guanina nucleotídeo
Grupo OVA	Animais submetidos a inalação com solução de ovalbumina
Grupo OVA-RHO	Animais submetidos a inalação com ovalbumina e inalação de Y-27632
Grupo SAL	Animais submetidos a inalação de soro fisiológico
Grupo SAL-RHO	Animais submetidos a inalação com soro fisiológico e inalação de Y-27632
GTP	Guanina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRAV	Hiperresponsividade das vias aéreas
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
JNK	Proteína quinase C-Jun-terminal
LAR	Resposta alérgica tardia
LPA	Ácido lisofosfatídico

LSAB	Biotina-streptavidina peroxidase
MEC	Matriz extracelular
MF	Miosinofosfatase
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase
MQ	Miosinoquinase
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NF	Fator nuclear
NIH	National Institutes of Health
nNOS	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
PEEP	Pressão positiva expiratória final
PFE	Pico de fluxo expiratório
PLC	Fosfolipase C
ROK	Rho quinase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
Rt	Resistência tecidual
RS	Retículo sarcoplasmático
T	Tensão
TCR	Receptor de célula T
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
V	Volume

Righetti RF. *Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica: modulação da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas inflamatórias, da matriz extracelular e do estresse oxidativo no parênquima pulmonar* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: A relevância do parênquima pulmonar distal na fisiopatologia da asma tem sido intensamente enfatizada. Vários estudos sugerem a inibição da Rho quinase como uma intervenção benéfica e promissora na asma. Entretanto, não há estudos anteriores que avaliaram os efeitos destes inibidores na modulação da mecânica do parênquima pulmonar e suas alterações histopatológicas em um modelo animal de inflamação pulmonar alérgica crônica. **OBJETIVO:** Avaliar a inibição da Rho quinase (Y-27632) na modulação da responsividade, inflamação, remodelamento da matriz extracelular e ativação do estresse oxidativo no parênquima pulmonar de cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica. **MÉTODOS:** As cobaias receberam sete inalações de ovalbumina (1-5 mg / ml; grupo OVA) ou salina (grupo SAL) ao longo de quatro semanas. A partir da quinta inalação, os animais do grupo Rho quinase foram submetidos a inalação com Y-27632, 10 minutos antes de cada inalação com OVA ou SAL. Setenta e duas horas após a sétima inalação, os animais foram anestesiados e exanguinados, e das tiras do tecido pulmonar foram realizadas a mecânica oscilatória, sob condições basais e após o desafio de ovalbumina (0,1%). Após a mecânica, as fatias de pulmão foram submetidas a análise histológica por meio da morfometria. **RESULTADOS:** A inibição de Rho quinase nos animais expostos à ovalbumina atenuou a elastância e a resistência tecidual, o número de eosinófilos, a expressão de IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, TIMP-1, MMP-9, TGF- β , IFN- γ , NF- κ B e iNOS e o conteúdo de 8-iso-PGF₂, fibras elásticas, fibras colágenas e actina em comparação com o grupo OVA (P<0,05). **CONCLUSÃO:** A inibição da Rho quinase contribui para o controle da capacidade de responsividade do parênquima pulmonar, da inflamação eosinofílica, das respostas Th1/Th2, ao controle do remodelamento da matriz extracelular em um modelo animal de inflamação pulmonar alérgica crônica. Podendo ser considerada uma futura ferramenta farmacológica para o tratamento de doenças pulmonares crônicas.

Descritores: asma, quinases associadas a Rho, cobaias

SUMMARY

Righetti RF. *Treatment with Rho-kinase inhibitor in guinea pigs with chronic allergic inflammation: modulation of eosinophilic inflammation, expression of inflammatory cytokines, extracellular matrix and oxidative stress in lung tissue* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

RATIONALE: Previous studies with Rho-kinase inhibitors suggest a beneficial influence of these drugs in asthma. The relevance of distal lung tissue in functional asthmatic impairment has been intensely emphasized. There have not been any previous studies evaluating the effects of these inhibitors on the modulation of distal lung mechanics and histopathological alterations in an animal model of chronic pulmonary inflammation. **OBJECTIVE:** To evaluate if Rho-kinase inhibition (Y-27632) modulates distal lung responsiveness, inflammation, extracellular matrix remodeling and oxidative stress activation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. **METHODS:** Guinea pigs received seven inhalations of ovalbumin (1–5 mg/ml; OVA group) or saline (SAL group) over 4 wk. From the 5th inhalation, the Rho-kinase group animals were submitted to Y-27632 inhalation 10 min before each inhalation with OVA or SAL. Seventy-two hours after the seventh inhalation, the animals were anesthetized and exsanguinated, and oscillatory mechanics of the lung tissue strips were performed under the baseline condition and after the ovalbumin challenge (0.1%). Afterwards, the lung slices were submitted to morphometry. **RESULTS:** The Rho-kinase inhibition in the ovalbumin-exposed animals attenuated the tissue elastance and resistance, eosinophils, the IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, TIMP-1, MMP-9, TGF- β , IFN- γ , NF- κ B, iNOS-positive cells and the 8-iso-PGF2 α , elastic, collagen and actin content compared with the OVA group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Rho-kinase inhibition contributes to the control of distal lung responsiveness and the eosinophilic and Th1/Th2 responses to the control of extracellular matrix remodeling in an animal model of chronic allergic inflammation. It may be considered a future pharmacological tool for the treatment of chronic pulmonary diseases.

Descriptors: asthma, rho-associated kinases, guinea pigs

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma Brônquica

1.1.1 Definição

Tradicionalmente a asma é definida como uma doença crônica caracterizada por hiper-responsividade brônquica e inflamação pulmonar. Porém, este tipo de definição, muitas vezes não permite distinguir a asma de outras doenças, porque as características patológicas comumente descritas não são unicamente exclusivas da asma. Adicionalmente, não pode ser descrita por uma causa, pois há vários fatores responsáveis pelo desencadeamento e predisposição à doença (Tattersfield et al., 2002; Hargreave e Nair, 2009).

Considerada uma condição heterogênea, a história natural da asma inclui episódios agudos (exacerbações) que revertem espontaneamente ou com tratamento, sobre um segundo plano de inflamação crônica e/ou mudanças estruturais que podem estar associadas a sintomas persistentes e redução da função pulmonar (Reddel et al., 2009; Lemanske e Busse, 2010 e GINA, 2011).

A asma apresenta determinantes genéticos e ambientais. Contudo, sua patogênese não está completamente elucidada e grande parte da sua definição ainda é descritiva. Considerando detalhadamente a recente definição para a asma, elaborada em 2011 pela *Global Initiative National of*

Asthma (GINA), em que levam em consideração suas características clínicas, fisiológicas e patológicas, encontramos que:

“A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas em que muitas células e elementos celulares são recrutados. A inflamação crônica é associada com hiperresponsividade das vias aéreas com recorrentes episódios de sibilos, dispneia, tosse, particularmente à noite e pela manhã. Esses episódios são associados à obstrução ao fluxo aéreo pulmonar, que é frequentemente reversível com o tratamento ou espontaneamente”

A asma é uma doença multifatorial que pode acometer todas as faixas etárias. Há dois fatores principais que podem gerar o desenvolvimento da inflamação e a hiper-responsividade brônquica presentes na crise asmática. O primeiro fator inclui os fatores predisponentes (genéticos) e o segundo fator existente é uma estreita relação entre os fatores ambientais e a doença, tais como: poeira, alimentos, fármacos, pólen, fungos, insetos, exercício, alterações ambientais e meteorológicas, poluentes atmosféricos, infecções, irritantes químicos, estresse e vários outros (Hashimoto et al., 2002b; Lemanske e Busse, 2010). A hiper-responsividade é a principal responsável pelos recorrentes episódios de sibilos, dispneia, tiragem intercostal e tosse (Brannan, 2010). De forma geral, os mecanismos que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma são extremamente complexos e interativos.

Na maioria dos indivíduos asmáticos, a doença tem sua origem durante a infância, com tendência ao desaparecimento de episódios de sibilos (chiadores transitórios) com o passar dos anos. Outros evoluem com

sintomas persistentes que podem cessar ainda na adolescência, mas alguns evoluem com sintomas persistentes que podem tanto cessar antes da adolescência (indivíduos primariamente não atópicos) quanto continuar pela adolescência (indivíduos atópicos). Uma vez em remissão, a doença pode permanecer em repouso, ou o indivíduo pode apresentar recaídas ao longo da fase adulta (Lemanske e Busse, 2010).

1.1.2 Epidemiologia

A asma é um sério problema de saúde global, sendo uma das doenças crônicas mais comuns no mundo. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 300 milhões de pessoas são acometidas e aproximadamente 250 mil pessoas morrem por ano vítimas desta doença no mundo. O aumento da prevalência da asma está associado à crescente urbanização da população mundial.

A perspectiva é de que até 2025 haja um crescimento de 14% na população urbanizada, com consequente aumento de 100 milhões na população asmática (Masoli et al, 2004). A prevalência global da doença varia entre 1% e 18% da população nos diferentes países (Bateman et al., 2008). A Figura 1 mostra a distribuição de prevalência da asma ao redor do mundo.

Figura 1. Mapa mundial de prevalência de asma (Adaptado de Masoli et al., 2004).

O *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) foi um importante estudo idealizado para avaliar a prevalência de asma e doenças alérgicas em crianças e adolescentes em diferentes partes do mundo. No Brasil, sete centros de saúde (localizados nas cidades de Recife, Salvador, Uberlândia, Itabira, São Paulo, Curitiba e Porto Alegre) participaram do estudo. A prevalência média de asma foi mais alta entre garotos do que entre garotas. De modo geral, o estudo revelou alta prevalência de sintomas de asma (20%-25%) na maioria das cidades brasileiras (Solé et al., 2001).

Considerando os dados do Ministério da Saúde (Base de dados do Sistema Único de Saúde) em 2011, o Brasil apresentou avanços na assistência a pacientes com a doença atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O número de internações, na rede pública de saúde, caiu 51% nos últimos dez anos: diminuiu de 397.333, em 2000, para 192.601, em 2010. A queda se deve, entre outros fatores, à ampliação do acesso a medicamentos pelo SUS e à melhoria da política de atenção básica à saúde do Ministério da Saúde, que são focadas em ações de prevenção e promoção da saúde (Ministério da Saúde, 2011).

A maioria dos pacientes apresenta doença leve, mas uma minoria significativa sofre de formas mais graves da doença, apesar de condutas médicas adequadas. O atendimento e os cuidados a estes pacientes, principalmente os graves, estão associados a repercussões psicossociais e econômicas, representando um sério problema na saúde pública mundial (Buc et al., 2009; GINA, 2011). Nas repercussões pessoais, é importante ter em mente as perdas por prejuízo de produtividade, aposentadoria precoce, absenteísmo escolar e no trabalho, e o mais grave, o óbito prematuro por insuficiência respiratória (Neffen et al., 2005).

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

1.1.3 Fisiopatogenia da Asma

Na grande maioria das pessoas, os diversos fatores alérgenos são geralmente bem tolerados, mas em pacientes asmáticos, a resposta frente a sua exposição é o desencadeamento de uma resposta inflamatória (Buc et al., 2009).

O processo inicial para o desenvolvimento da asma é a sensibilização, na qual as células dendríticas presentes na mucosa brônquica atuam como apresentadoras de antígeno (Brannan, 2006).

As células apresentadoras de antígenos também têm como função induzir tolerância a estes antígenos. Os macrófagos podem suprimir as respostas imunológicas pulmonares por modularem a atividade das células dendríticas, processo conhecido como tolerização (Kuipers e Lambrecht, 2004). Quando não ocorre a tolerização, as interações das células dendríticas com os linfócitos Th2 fazem com que os linfócitos B produzam imunoglobulinas E (IgE), que quando liberadas na circulação, se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos (Bousquet et al., 2000).

Após a fase de sensibilização, quando houver o próximo contato do indivíduo com o antígeno, a grande maioria dos asmáticos desenvolve uma resposta inflamatória imediata e outra tardia. A fase imediata é uma resposta que se inicia logo após o contato com o antígeno (2 a 4 horas após o contato com o antígeno) e a ativação das células que liberam a IgE. É caracterizada pela rápida ativação de mastócitos e macrófagos das vias aéreas. O

principal fator responsável pela obstrução das vias aéreas nesta fase é a contração da musculatura lisa brônquica, que ocorre devido à degranulação dos mastócitos que juntamente com os macrófagos e os linfócitos T liberam mediadores inflamatórios como a histamina, prostaglandinas e cistenil-leucotrienos (Holgate, 2001).

A ativação das células dendríticas pelos alérgenos leva a uma cascata de eventos que culmina na produção de citocinas que atraem neutrófilos, monócitos e células dendríticas para as vias aéreas, além de transformar células T CD4⁺ em células de perfil Th2. Os linfócitos Th2 ativados orquestram a cascata inflamatória. Quando ativada, a célula Th2 libera interleucinas (IL), tais como IL-4, IL-5 e IL-13.

A IL-4 estimula os linfócitos a produzir IgE, que então se liga à superfície dos mastócitos (Buc et al., 2009). Há evidências de 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, leucotrienos e prostaglandinas. A IL-4 liberada dos mastócitos serve para perpetuar a produção de IgE e consequentemente dos eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5, especificamente, recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendeles et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010).

Os eosinófilos são granulócitos aproximadamente do mesmo tamanho dos neutrófilos, da linha mieloide. Esses eosinófilos são encontrados em grande quantidade em órgãos com interface epitelial como o trato

gastrointestinal e trato respiratório, sendo uma condição característica da inflamação alérgica (McFadden e Gilbert, 1992; Hendeles et al., 2004).

O início da fase tardia envolve o recrutamento e ativação de eosinófilos, células T CD4⁺, basófilos, neutrófilos e macrófagos para as vias aéreas. Esta fase ocorre a partir de 3 a 6 horas após o contato com o antígeno, podendo persistir por vários dias. A inflamação das vias aéreas é uma interação complexa entre diferentes tipos de mediadores e células, o que é fundamental para que ocorram as alterações características do processo de remodelamento tecidual observado na asma brônquica (Bousquet et al., 2000).

Estas células promovem inflamação, alteração vascular, hipersecreção de muco, desprendimento epitelial, aumento da hiperresponsividade das vias aéreas e a obstrução ao fluxo aéreo. Quando ativados, os eosinófilos liberam leucotrienos (produtos do metabolismo oxidativo) e outras substâncias, tais como fatores de crescimento e metaloproteinases, envolvidos no remodelamento das vias aéreas. Os leucotrienos liberados tanto dos mastócitos quanto dos eosinófilos são potentes broncoconstritores e perpetuam a migração de eosinófilos para as vias aéreas (Vignola et al., 2000; Hendeles et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010). A Figura 2 mostra um esquema ilustrativo do mecanismo fisiopatológico da asma.

Figura 2. Esquema ilustrativo do mecanismo fisiopatológico da asma envolvendo diversas células e mediadores inflamatórios. As respostas alérgicas são predominantemente de perfil Th2 e envolvem, principalmente, as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Adaptado do GINA, 2011).

1.1.3.1 Citocinas Inflamatórias na Asma

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

As citocinas estão envolvidas na sinalização célula a célula, crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose. As ações das citocinas são mediadas por intermédio de receptores específicos presentes na superfície das células-alvo. Embora as citocinas normalmente tenham efeito sobre as células

adjacentes, elas podem agir a distância e ter efeitos sobre as próprias células que as produzem (Hamid e Tulic, 2009).

As citocinas podem ser produzidas por diversos tipos de células inflamatórias, tais como linfócitos T e eosinófilos, e estruturais, incluindo células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (Hamid e Tulic, 2009).

Atualmente foram identificados mais de 30 citocinas envolvidas na patologia da asma. Dentre elas estão as derivadas de células T, tais como as chamadas células T helper-1 (Th1), incluindo interleucina(IL)-2, interferon (IFN)- γ e IL-12; células Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25); Th3 ou citocinas T regulatórias [IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)]; e células Th17 (IL-17) (Hamid e Tulic, 2009).

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

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

Muitas destas citocinas apresentam sobreposições de funções, tornando difícil a diferenciação dos papéis individuais na patogênese da

asma e das doenças alérgicas (Barnes, 2008). Contudo, do ponto de vista didático podemos classificá-las em:

- Linfocinas:** são secretadas por células T e regulam a resposta imunológica;
- Citocinas de predomínio pró-inflamatório:** tendem a amplificar e perpetuar o processo inflamatório;
- Fatores de crescimento:** promovem a sobrevivência de células que resulta em mudanças estruturais nas vias aéreas;
- Quimiocinas:** são citocinas quimiotáticas para o processo inflamatório;
- Citocinas de predomínio anti-inflamatório:** tendem a atenuar a resposta inflamatória.

Estes mediadores podem ainda atingir o epitélio ciliado, causando dano e ruptura. Constituem um papel importante no processo de remodelamento que interfere na arquitetura pulmonar, levando a alterações morfofuncionais que podem ocorrer em alguns pacientes asmáticos (Kumar, 2001).

Tabela 1. Sumário das principais citocinas e seus efeitos (Adaptado do Hamid e Tulic, 2009)

Citocina	Atividade Biológica
IL-2	Eosinofilia Crescimento/diferenciação das células T
IL-4	Regulação do crescimento, diferenciação, ativação e função de células B
IL-5	Eosinofilia e regulação de eosinófilos Hiper-responsividade brônquica
IL-10	Ação anti-inflamatória Diminui a sobrevivência de eosinófilos Diminui a hiper-responsividade brônquica Diminui a ativação de mastócitos/macrófagos
IL-13	Produção de IgE Hipersecreção de muco Ativação de eosinófilos
IFN- γ	Diminui o influxo de eosinófilo Controla o equilíbrio Th1/Th2 Inibibe a resposta alérgica Diminui produção de IgE Diminui hiper-responsividade brônquica
TGF- β	Remodelamento Citocina pró-fibrótica Quimiotaxia de células inflamatórias

1.1.3.2 Remodelamento

Tecidos e células geralmente são capazes de se regenerar ou de se adaptar às demandas de lesões. Estas adaptações teciduais frente às lesões contínuas desencadeiam alterações de estrutura, geometria e propriedades teciduais, e este processo é chamado de remodelamento tecidual (Lawrance, 2001). Isso ocorre em uma ampla variedade de tecidos e

órgãos, incluindo a pele, os vasos sanguíneos, tecido do coração, trato gastrointestinal, vias aéreas e nos tecidos pulmonares (Minicucci et al., 2009).

Como discutido anteriormente, a asma é uma doença na qual muitas células inflamatórias estão envolvidas. Estas células liberam 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 das vias aéreas, chamado de remodelamento das vias aéreas (Al-Muhsen et al., 2011). Estas alterações estruturais são parcialmente reversíveis em asma leve, mas muitas vezes são irreversíveis na asma grave (Vignola, 2003).

O processo de remodelamento das vias aéreas é a principal causa de sintomas associados com à diminuição da função pulmonar (Lazaar e Panettieri, 2003). Ele é iniciado como um processo de reparação em resposta às lesões das vias aéreas induzidas pela inflamação. No entanto, a falta de equilíbrio entre o processo de lesão e cicatrização conduz ao remodelamento tecidual (Postma e Timens, 2006).

Segundo James e Wenzel (2007), várias alterações estruturais são responsáveis pelo remodelamento das vias aéreas de indivíduos asmáticos, todas elas contribuindo para um aumento global na espessura da parede das vias aéreas:

- **Espessamento da membrana basal reticular:** decorrente do aumento da deposição de colágenos tipo I e III, tenascina e fibronectina. Estas

proteínas são ativadas pelos miofibroblastos e levam à chamada fibrose subepitelial;

– **Matriz extracelular:** alterada pela presença de quantidade anormal de fibras elásticas, fibras colágenas e proteínas. Como as proteínas da matriz extracelular têm diversas funções incluindo integridade estrutural, equilíbrio hídrico, migração celular, agregação de proteínas estruturais, elaboração de fatores de crescimento e proteínas, além de atividade osmótica, sua alteração tem impacto sobre a geometria, a distensibilidade e até mesmo a função das vias aéreas;

– **Vasos sanguíneos:** o remodelamento da parede das vias aéreas está associado ao aumento da vascularidade, vasodilatação e insuficiência vascular. A asma está relacionada ao aumento do número e tamanho dos vasos brônquicos, incluindo os pequenos vasos sanguíneos da submucosa;

– **Músculo liso:** sofre hipertrofia e hiperplasia, o que leva a um aumento do músculo liso das vias aéreas. Além disso, o espessamento do músculo liso pode ocorrer por um aumento da matriz extracelular dentro das camadas de músculo liso;

– **Glândulas mucosas:** é evidenciado pelo aumento em volume e número destas glândulas, que ficam presentes até mesmo em bronquíolos periféricos, onde normalmente estão ausentes. O acúmulo de muco associado a estas alterações produz estreitamento da luz das vias aéreas. O espessamento da parede das vias aéreas relacionado às

alterações de matriz extracelular, músculo liso, epitélio e membrana basal reticular amplifica estes efeitos.

Todas estas alterações podem contribuir para os sintomas de exacerbação observados na asma (Fahy, 2001; James e Wenzel, 2007; Sumi e Hamid, 2007). Entretanto, o real impacto do remodelamento tecidual sobre a função pulmonar ainda não está completamente elucidado. A Figura 3 mostra a fotomicrografia das alterações estruturais da via aérea de um asmático quando comparada a uma via aérea normal.

Figura 3. Fotomicrografia evidenciando a significativa alteração estrutural da via aérea na asma. O epitélio do asmático apresenta hiperplasia e presença de uma grande quantidade de muco (azul), espessamento da membrana basal (MB), aumento do volume de musculatura lisa (ML) e redução do diâmetro do lúmen da via aérea (Adaptado de Halwani, 2010).

O remodelamento tem início com a infiltração tecidual de células inflamatórias que podem envolver tanto o recrutamento de células maduras

da corrente sanguínea quanto proliferação dos progenitores na submucosa. A sobrevivência destas células é influenciada em grande parte pelo microambiente dentro da parede das vias aéreas (Vignola et al., 2000). As células danificadas são removidas por apoptose que tende a limitar a lesão inflamatória e promover resolução da inflamação (Hasslett et al., 1994; Vignola et al., 2000). Entretanto, ao mesmo tempo, como citado anteriormente, estas células também podem persistir e promover a manutenção do infiltrado inflamatório, bem como induzir mudanças permanentes nas vias aéreas. Estes processos de lesão e reconstituição podem ocorrer tanto nas vias aéreas proximais quanto no parênquima pulmonar (Crosby e Waters, 2010).

Os macrófagos ativados têm o potencial de secretar uma ampla variedade de produtos, muitos dos quais exercem grande função na patogênese da lesão e reparo. Estas células podem estar envolvidas na regulação do remodelamento das vias aéreas por meio de secreção de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas, fator básico de crescimento de fibroblastos ou fator transformador de crescimento beta (TGF- β), que provavelmente estão envolvidos na fibrose (Vignola et al., 1996). A expressão de TGF- β parece estar correlacionada com o grau de fibrose subepitelial (Vignola et al., 2003).

Estudos demonstram um número grande de mastócitos nos feixes da musculatura lisa das vias aéreas de pacientes com asma, sugerindo que a infiltração destas células nas vias aéreas da musculatura lisa pelos mastócitos está associada com a piora da função pulmonar dos pacientes

asmáticos. Um importante mediador expressado pelos mastócitos após a sua degranulação é a triptase. Esta protease é um potente estimulante da proliferação de fibroblastos e de células da musculatura lisa, e é capaz de estimular a síntese de colágeno de tipo I por fibroblastos (Akers et al., 2000).

Os eosinófilos podem liberar citocinas, fatores de crescimento e elastase, além de ser uma fonte de expressão de TGF- β . Por isso, podem estar envolvidos no remodelamento e fibrose (Vignola et al., 2000). Os neutrófilos, por sua vez, participam desse processo por liberarem vários tipos de enzimas, incluindo protease e elastase (que degradam a matriz), radicais livres de oxigênio e citocinas (Lloyd e Oppenheim, 1992).

Os fibroblastos e os miofibroblastos participam do processo de remodelamento da matriz extracelular produzindo fibras colágenas, fibras elásticas, formação de novos filamentos miocontráteis, fibras reticulares, bem como proteoglicanos e glicoproteínas da matriz extracelular amorfa (Sheppard e Harrison, 1992). Estas células podem participar da inflamação crônica das vias aéreas por meio da interação com as citocinas inflamatórias de perfil Th1 e Th2 para modular a atividade da quimiotaxia de eosinófilos, linfócitos T ativados e mastócitos/macrófagos (Teran et al., 2009). Números aumentados de fibroblastos e miofibroblastos são encontrados nas vias aéreas de pacientes com asma, e este número parece correlacionar-se com o tamanho da membrana basal reticular (Holgate et al., 2000).

Por fim, existem proteases e inibidores de proteases envolvidos no processo de remodelamento das vias aéreas. As metaloproteinases (MMPs) degradam seletivamente componentes da matriz extracelular, além de

exercerem função crucial no tráfego de células inflamatórias e estruturais. Estas enzimas constituem uma família de 11 ou mais endopeptidases zinco-dependentes, que são expressas em baixo nível em tecido adulto normal, mas em níveis elevados durante o desenvolvimento, reparo tecidual, inflamação, invasão tumoral e metástases (Lee et al., 2001).

Fatores de crescimento e citocinas podem induzir ou inibir a transcrição de genes das MMPs (Lee et al., 2001). 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 (Cataldo et al., 2003). Na asma as MMPs 2, 8, 9, 12 e o inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP)-1 são os principais envolvidos (Cataldo et al., 2003).

A MMP-9, proveniente de células inflamatórias e estruturais pulmonares, pode degradar o colágeno, proteoglicanos e elastina, sendo um importante mediador da degradação da matriz extracelular (Vignola et al., 2003; Tang et al., 2005). Com o aumento da MMP-9, há um excesso de seu inibidor TIMP-1, na tentativa do organismo reparar o dano (Tang et al., 2006). O excesso de TIMP-1 sobre a MMP-9 em indivíduos asmáticos pode interferir no tráfego celular e reparo tecidual, e também pode contribuir para o aumento na deposição de matriz extracelular e fibrose pela inibição da MMP-9. Por outro lado, logo após o desafio com alérgeno em asmáticos, ocorre aumento na MMP-9, resultando em uma alta proporção MMP-9/TIMP-1, o que sugere que a degeneração da matriz extracelular e da membrana

basal pelas MMPs pode ocorrer já na fase inicial da exacerbação da asma, e que a produção de TIMP-1 pode acompanhar ou seguir o aumento da MMP-9 para inibir estes processos (Vignola et al., 2003). Estudos demonstram que a asma está associada a um aumento do nível de MMP-9 e TIMP-1 no escarro e lavado broncoalveolar dos indivíduos acometidos (Tang et al., 2006).

Mesmo o remodelamento sendo um processo prejudicial decorrente da asma, acredita-se que ocorra na tentativa de proteção dos pulmões. Alguns estudos mostram que sem o remodelamento o paciente seria ainda mais acometido pelos sintomas e função pulmonar anormal (James e Wenzel, 2007). A Figura 4 mostra um esquema representativo da interação entre células imunológicas, inflamatórias e estruturais na patogênese da asma.

Figura 4. Representação esquemática da interação entre células imunológicas, inflamatórias e estruturais nas vias aéreas e parênquima pulmonar na patogênese da asma (Adaptado de Holgate, 2008).

1.1.3.3 Óxido Nítrico, estresse oxidativo e isoprostanos

A molécula de óxido nítrico (NO) durante muitos anos foi conhecida como um nocivo poluente ambiental proveniente da fumaça de cigarros (Norman et al., 1965). No entanto, durante a década de 1980, pesquisadores demonstraram que o NO é 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).

O NO é considerado 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).

As isoformas eNOS e nNOS são óxido nítrico sintase constitutivas (cNOS) e estão presentes normalmente em situações fisiológicas. Além disso, são enzimas cálcio-dependentes e produzem uma pequena quantidade de óxido nítrico. No entanto, estas isoformas constitutivas parecem realizar um efeito protetor de vasodilatação e broncodilatação (Kobayashi et al., 2006).

Por outro lado, as iNOS são estimuladas por muitas citocinas pró-inflamatórias e são expressas em alguns tipos de células inflamatórias podendo resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th2, contribuindo para os sinais e sintomas característicos da asma (Ricciardolo et al., 2004).

Estas enzimas são expressas por diferentes tipos de células, incluindo células do sistema respiratório e do parênquima pulmonar e são as responsáveis por catalisar a formação de óxido nítrico por meio da conversão enzimática do aminoácido arginina em citrulina (Kharitonov et al., 1995; Chapman et al., 2001; Fischer et al., 2002). A Figura 5 mostra a formação do óxido nítrico por intermédio dos diferentes tipos de NOS.

Figura 5. (A) cNOS é ativada pelo aumento no Ca^{2+} em resposta à ativação a um receptor de superfície. (B) iNOS é induzida por citocinas ou lipossacarídeos, resultando em maiores quantidades de formação de NO (Adaptado de Zoritch, 1995).

Os radicais livres podem ser formados após ativação de várias células inflamatórias. Quando as células das vias aéreas e os tecidos são expostos ao estresse oxidativo desencadeado por reações inflamatórias exacerbadas,

ocorre um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são responsáveis por vários efeitos deletérios nas vias aéreas induzindo diversas condições patológicas (Wood et al., 2003).

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 ($ONOO^-$) (Pryor e Squadrito, 2005).

O peroxidonitrito ($ONOO^-$) é altamente citotóxico, sendo responsável por induzir hiper-responsividade 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 co (DNA), 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 nas vias aéreas na asma (Shiraki et al., 2008).

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 mediação 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 (Lawson et al., 1999). Estes componentes são úteis biomarcadores para o estresse oxidativo, estando os isoprostanos aumentados 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-*isso*-PGF₂ α é o melhor caracterizado (Lawson et al., 1999). O 8-*isso*-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-*isso*-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., 2008).

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

Descoberto em 1986, o NF- κ B é um fator nuclear que uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de dez pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κ B) (Chen et al., 1999).

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

Segundo Tripathi e Aggarwal (2006), independente do estímulo parece haver participação do estresse oxidativo e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF- κ B. Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (I κ B). Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação (Figura 6).

Figura 6. Esquema representativo mostrando a translocação do NF-κB para o núcleo (Adaptado de Xiao, 2004).

O NF-κB age como um fator de transcrição, com ação descrita em diversas células que compõem os organismos, apresentando uma gama de ações superiores a todos os outros fatores de transcrição até então caracterizados (Xiao, 2004). Essa superioridade deve-se aos vários estímulos que o ativam, tais como: neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, licocorticóides, peptídeos natriuréticos atrial, ceramidas, vírus, bactérias e o óxido nítrico sintase induzida (Hart et al., 1998 o). A Figura 7 mostra um esquema de toda a reação envolvendo o óxido nítrico e o estresse oxidativo.

Figura 7. Representação esquemática do mecanismo da produção da peroxidação lipídica na asma. IL: interleucina, Th2: célula T helper tipo 2; NO₂: dióxido de nitrogênio; ROS: espécies reativas de oxigênio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; -OH: radical hidroxila; NADPH: nicotaminada adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; NADP: nicotaminada adenina dinucleotídeo fosfato; SOD: superóxido dismutase; EPO: peroxidase eosinofílica; MPO: mieloperoxidase; NFκB: fator de transcrição nuclear (Adaptado de Wood, 2003).

1.1.3.4 Importância do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma

Atualmente é possível a mensuração e avaliação da fisiologia pulmonar devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, sendo possível demonstrar que a porção distal do pulmão contribui para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (Yanai et al., 1992; Wagner et al., 1998).

É importante considerar 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 na patogênese e no tratamento da doença (Tulic et al., 2003).

Desta forma, tem sido proposto que o pulmão periférico, considerado como as vias aéreas de calibre menor ou igual a dois milímetros de diâmetro e o parênquima pulmonar adjacente, podem ter um papel fundamental na resistência pulmonar total, atentando para a possibilidade da participação também do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que provavelmente altera o conceito e principalmente a forma de pensar sobre o tratamento da doença (Bachofen, 1966, Angeli et al. 2008).

Estes fatos 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 e não 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 (Tulic et al., 2003).

Dentro desta linha de pesquisa, estudos mostraram que o parênquima pulmonar periférico de pacientes asmáticos apresenta alterações de inflamação e remodelamento da matriz extracelular (Hamid, 1997; Tulic et al., 2003; Mauad et al., 2004).

Carrol et al. (1997) demonstraram que o aumento no número de linfócitos e eosinófilos era uniformemente distribuído ao longo das vias aéreas proximais e distais em pacientes com asma grave e moderada comparativamente aos indivíduos controle. Alguns autores já demonstraram o aumento no número de células T (CD₃), eosinófilos total, eosinófilos ativados, assim como um aumento na expressão de mRNA positivo para IL-5 e IL-4 nas vias aéreas distais de pulmões ressecados de indivíduos asmáticos comparativamente aos indivíduos normais (Hamid et al., 1997, Minshall et al., 1998).

Neste sentido, Haley et al. (1998) avaliaram a distribuição de células CD45+ dentro de regiões subepiteliais da parede de vias aéreas e mostraram que nas vias aéreas distais de indivíduos asmáticos, a maioria das células leucócitos e eosinófilos CD45+ está na região externa à parede da via aérea (definida como a área entre o músculo liso e o alvéolo) enquanto que nas grandes vias aéreas dos mesmos indivíduos a maioria da densidade destas células se encontra no interior da parede da via aérea (definida como área entre a membrana basal e o músculo liso).

A diferente organização das células inflamatórias através da árvore traqueobrônquica pode ser atribuída às diferenças nos mecanismos de recrutamento de células inflamatórias ou às diferenças na produção de

citocinas e quimiocinas entre estas regiões. Estas diferenças podem influenciar a resposta fisiológica causada pela produção local de mediadores inflamatórios (Tulic e Hamid, 2006)

Estas alterações também foram reproduzidas em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009). Considerando o remodelamento pulmonar, Xisto et al. (2005) demonstraram um aumento do conteúdo de colágeno e de actina em fatias de tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em ratos. Estas alterações apresentaram uma correlação positiva com o aumento da resistência e elastância, 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*.

Como citado acima, em modelos de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias que receberam inalações repetidas de ovalbumina, ocorre aumento dos eosinófilos e da responsividade do tecido pulmonar (Nakasima et al., 2008; Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009)

Neste mesmo modelo experimental, Angeli et al. (2008) e Starling et al. (2009) demonstraram que no septo alveolar há aumento de fibras colágenas e elásticas, de resistência e elastância do parênquima pulmonar, da densidade de eosinófilos, do número de células positivas para iNOS e nNOS e do conteúdo de 8-iso-PGF2 α , um marcador de estresse oxidativo.

Sendo assim, vários autores têm utilizado fatias de tecido pulmonar periférico para avaliação do papel do parênquima na inflamação pulmonar

alérgica crônica (Dolhnikoff et al., 1994; Xisto et al., 2005; Lanças et al., 2006; Angeli et al., 2008). As fatias de tecido pulmonar (*strips*) analisadas por meio de mecânica oscilatória têm sido usadas como instrumento capaz de elucidar as propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão. Neste sentido, Salerno et al. (1995; 1998; 2004) realizaram vários estudos utilizando esta técnica e demonstraram que o fragmento pulmonar periférico seria um modelo ideal para o estudo das propriedades reais da mecânica pulmonar, uma vez que as vias mais proximais podem sofrer maior influência da parede brônquica na determinação da resposta mecânica.

1.1.4 Modelos experimentais de asma

Os modelos experimentais contribuem com importantes informações a respeito da fisiopatologia da asma e com a elaboração de novas estratégias terapêuticas, mas não podemos dizer que há um verdadeiro “modelo de asma”, uma vez que as complexidades da doença humana não são reprodutíveis em nenhum animal (Vargaftig, 1999). Não se conhece nenhum animal de laboratório que desenvolva espontaneamente uma doença com características que possam ser consideradas como sendo asma (Szelenyi, 2002). O que existem são modelos de inflamação alérgica, de respostas imediatas e/ou tardias e estes modelos, quando associados no mesmo animal e em cronologia adequada, constituem uma representação limitada de características da doença (Vargaftig, 1999).

Assim, embora não exista modelo ideal de asma humana, é necessário seguir com a realização de experimentos em modelos animais que mimetizem as diversas manifestações do estado asmático humano, levando-se em consideração que a correlação entre os processos observados nos modelos e nos seres humanos deve ser cuidadosamente considerada (Zosky e Sly, 2007). De qualquer forma, os modelos experimentais têm sido aperfeiçoados. Para serem adequados no estudo da asma, os modelos animais devem contemplar reatividade das vias aéreas, produção de IgE, perfil de citocinas, resposta imunológica e remodelamento (Bile e Green, 2000; Gimeno, 2003).

A variedade de modelos animais de asma é ampla e envolve diferentes espécies. Camundongos, ratos, cobaias, cães, ovelhas, macacos e cavalos têm sido utilizados no estudo de processos inflamatórios e alterações na função das vias aéreas. Individualmente, cada um destes animais também possui certas vantagens e desvantagens como um modelo de inflamação alérgica das vias aéreas, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens individuais dos modelos animais de asma (Adaptado de Shin et al., 2009).

Animal	Vantagens	Desvantagens
Camundongo	IgE é o anticorpo anafilático primário Numerosos reagentes imunológicos Numerosas linhagens puras Fácil criação Período gestacional curto Pequeno e relativamente barato	Não apresenta hiper-responsividade espontânea Musculatura limitada nas vias aéreas Diferenças anatômicas pulmonares Não respondem à histamina Ausência de modelo crônico
Rato	IgE é o anticorpo anafilático primário Produz resposta duradoura nas vias aéreas Mostra respostas imediata e tardia nas vias aéreas	Necessita de injeção de alérgeno para sensibilização Necessita de adjuvantes para sensibilização Reagentes imunológicos específicos para a espécie pouco abundantes
Cobaia	O pulmão é o órgão primário de anafilaxia Responde a agonistas colinérgicos Mostra respostas imediata e tardia nas vias aéreas Inflamação pulmonar com eosinófilos e neutrófilos	IgG1 é o principal anticorpo anafilático Escassez de linhagens puras Poucos reagentes específicos para a espécie
Coelho	Mostra respostas imediata e tardia nas vias aéreas O pulmão é o órgão primário de anafilaxia IgE é o anticorpo anafilático primário	Imunização neonatal é necessária para a fase tardia da resposta das vias aérea na fase adulta
Grandes Animais	Cavalos desenvolvem desordens respiratórias naturalmente quando expostos a poeira de celeiro Macacos desenvolvem naturalmente sensibilidade a <i>Ascaris</i>	Difícil de manipular Caro

Segundo Gimeno (2003), pequenas espécies, como as cobaias, têm sido os animais mais utilizados na última década. As cobaias sensibilizadas com ovoalbumina e então desafiadas com aerossol do antígeno são frequentemente usadas como modelo animal para avaliação da função pulmonar e infiltração celular (Smith et al., 2007). Estes animais, quando sensibilizados com ovoalbumina, apresentam eosinofilia e

hiperresponsividade das vias aéreas (Sanjar et al., 1990). As respostas alérgicas nestes animais são causadas por muitos peptídeos, citocinas e quimiocinas com homologia às respostas dos humanos (Bile e Green, 2000).

O principal benefício da cobaia é a capacidade de atingir o pulmão como órgão-alvo primário de uma resposta de hipersensibilidade. Além disso, as cobaias apresentam tanto a fase imediata quanto tardia da broncoconstrição após desafio com antígeno em animais sensibilizados (Nabe et al., 1997; Smith et al., 2007), permitindo investigação mecanística das distintas fases, bem como determinar a inter-relação entre as respostas das fases imediata e tardia (Shin et al., 2009).

A anatomia e fisiologia do pulmão da cobaia assemelham-se à dos humanos, incluindo: epitélio pseudoestratificado na traqueia, nervos vagos aferentes innervando epitélio e espaços subepiteliais, presença de células caliciformes e glândulas mucosas nas vias aéreas, vasculatura subepitelial, células neuroendócrinas no epitélio, semelhança anatômica e funcional do músculo liso, recrutamento de diferentes células inflamatórias sobre desafio (Canning et al., 2008).

Portanto, os modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica, especialmente em cobaias, já demonstraram ser capazes de reproduzir características relacionadas ao processo inflamatório, reatividade de vias aéreas, estresse oxidativo e remodelamento de matriz extracelular (Tibério et al., 1997; Prado et al., 2006; Ruiz-Schütz et al., 2009; Prado et al., 2011).

1.2 Rho Quinase

Descoberta em 1985, mas estudada profundamente somente após 1991 a proteína Rho quinase foi identificada como constituinte da superfamília Ras de GTPases monoméricas e da subfamília Rho. Estas proteínas variam entre um estado GDP inativo e um estado GTP ativo. Para se tornar ativada, a Rho interage com alguns efetores, tais como a Rho quinase. A Rho quinase, um dos efetores melhor caracterizados da Rho, existe em duas isoformas: ROK α (também chamada ROCK2) e p160 ROCK (também chamada ROCK β ou ROCK 1). A proteína Rho quinase pode ser ativada pela Rho e pelo ácido aracdônico, que é liberado pelo músculo liso em resposta a vários agonistas (Wettschureck e Offermanns, 2002).

Esta proteína exerce muitas funções biológicas, incluindo migração, fagocitose, proliferação, secreção e manutenção da forma celular. A via Rho/Rho quinase também parece estar envolvida em uma ampla variedade de doenças associadas ao aumento de tônus da musculatura lisa ou com hiper-reatividade do músculo liso. Além disso, esta via também participa de processos patológicos envolvendo muitas células não musculares (Wettschureck e Offermanns, 2002).

A regulação da atividade da proteína Rho é feita por três grupos de proteínas: proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que facilitam a inativação da forma GTP ativa pelo aumento da atividade intrínseca da GTPase na Rho; inibidores de dissociação de GTPase (GDIs), que inibem algumas GTPases da família Rho por ligação a membranas e previnem a

dissociação e portanto a ativação de nucleotídeos; e fatores de troca guanina nucleotídeo específico para Rho (Rho GEFs), que facilitam a ativação da Rho por promover a dissociação de GDP e subsequentemente ligação de GTP. As Rho GEFs são consideradas os principais reguladores da atividade da Rho.

No entanto, a atividade da Rho também pode ser regulada por numerosos receptores de proteína G e a ativação da RhoA é fortemente dependente de sua modificação pós-translacional (isoprenilação) mediada por meio da atividade de geranilgeraniltransferase (Wettschureck e Offermanns, 2002; Schaafsma et al., 2008b; Casey, 1995).

1.2.1 Inibidores da Rho quinase

Os inibidores da Rho quinase são importantes por auxiliarem no desenvolvimento de pesquisas para o esclarecimento das atividades e funções desta proteína. Os principais inibidores da Rho quinase incluem o Y-27632 ([(+)-(R)-*trans*-4-(1-Aminoetil)-*N*-(4-piridil)cicloexanocarboxamida dihidrocloreto)], comumente utilizado como inibidor da Rho quinase em pesquisas e o fasudil HA-1077 [1-(5-isoquinolina-sulfonil)-homo-piperazina] (Mong e Wong, 2009).

O Y-27632 (Figura 8) é permeável na célula e age como um competidor com o local de ligação de ATP na Rho quinase, tendo uma ação inibitória sobre as atividades da ROCK1 e ROCK2 (Darenfed et al., 2007; Schaafsma et al., 2008b). Alguns análogos de Y-27632 foram sintetizados,

tais como o Y-30141 e o Y-30694, mas a afinidade destes inibidores é diferentes da do Y-27632 (Uehata et al., 1997). Devido a seus importantes efeitos sobre a Rho quinase, o Y-27632 tem sido considerado um potencial agente terapêutico para diversas doenças (Darenfed et al., 2007).

Figura 8. Estrutura do inibidor Y-27632 (Adaptado de Breitenlechner et al., 2003).

O inibidor fasudil tem uma menor seletividade pela Rho quinase em comparação ao Y-27632 (Schaafsma et al., 2008b). Apesar disso, é frequentemente usado em modelos animais e atualmente é o único inibidor de Rho quinase disponível para uso clínico. O uso clínico deste inibidor foi aprovado no Japão em 1995 para prevenção de vasoespasma em pacientes com hemorragia subaracnóidea (Hirooka e Shimokawa, 2005; Mong e Wong, 2009).

Existem outros inibidores da Rho quinase baseados em aminofurazam e azaindole que são mais potentes em inibir a ROCK1, mas ainda não foram estudados no contexto das doenças das vias aéreas (Schaafsma et al., 2008b).

1.2.2 Rho Quinase e a asma

Uma das principais características da asma encontrada em praticamente todos os pacientes com esta doença é a presença da hiperresponsividade das vias aéreas. Entretanto, há variabilidade considerável na intensidade da hiperresponsividade das vias aéreas nos pacientes com asma, e o nível de hiperresponsividade é variável tanto entre os pacientes quanto nos próprios indivíduos, sendo que graus mais elevados de hiperresponsividade são normalmente proporcionais à gravidade da asma subjacente; aqueles com doença mais grave das vias aéreas frequentemente apresentam maior grau de hiperresponsividade (Cockcroft e Davis, 2006; Busse, 2010).

A relação entre Rho quinase e hiperresponsividade das vias aéreas já foi demonstrada em diferentes estudos, onde a diminuição da sensibilização do Ca^{2+} por meio do inibidor da Rho quinase Y-27632 é capaz de relaxar completamente o músculo liso das vias aéreas (Yoshii et al., 1999; Iizuka et al., 2000). (Chiba et al., 1999; Schaafsma et al., 2004; Witzénrath et al., 2008).

O tônus das vias aéreas é controlado principalmente pelo sistema parassimpático. Já foi demonstrado que a inibição da Rho quinase diminui as respostas contráteis mediadas por nervos colinérgicos, com redução do tônus do músculo liso das vias aéreas (Fernandes et al., 2006). A Rho quinase altera o tônus da musculatura lisa modulando a liberação de neurotransmissor dos nervos colinérgicos das vias aéreas, mas os

mecanismos exatos responsáveis por essa modulação não são conhecidos (Fernandes et al., 2007). Em outro estudo, Chiba et al. (2001), demonstraram que a inibição da Rho quinase atenua as respostas de contração induzida por acetilcolina no músculo liso brônquico por meio da inibição da sensibilização do Ca^{2+} mediada pela via Rho/Rho quinase.

Embora o Y-27632, assim como os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos, aumente a liberação de acetilcolina nos nervos colinérgicos das vias aéreas, seu efeito sobre o músculo liso das vias aéreas se sobrepõe ao aumento na liberação de neurotransmissor (Fernandes et al., 2006).

A contração do músculo liso induzida por agonistas é uma das características da asma, contribuindo para a resistência ao fluxo aéreo. O tônus da musculatura lisa é primariamente regulado pelo nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) por mecanismos dependentes e independentes de cálcio (Ca^{2+}). Um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , decorrente da ativação dos canais de cálcio na membrana plasmática e/ou liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, leva à formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, resultando na ativação da miosinoquinase. Esta enzima fosforila a CLM, resultando em contração da musculatura lisa por ligação entre a actina e a miosina (Kamm et al., 1985; Chiba e Misawa, 2004; Hashimoto et al., 2002b; Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010). Como os filamentos de actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e membrana plasmática por estruturas conhecidas como corpos densos e placas densas, o miócito se contrai (Sylvester, 2004). A

extensão da contração é determinada pelo equilíbrio da atividade entre a miosinoquinase e a miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006; Somlyo et al., 2003).

Esta sequência de eventos prediz que o tônus da musculatura lisa deveria ser proporcional à concentração de Ca^{2+} citosólico. Entretanto, na presença de uma concentração fixa de Ca^{2+} , agonistas broncoconstritores também podem elevar a fosforilação da CLM. Além disso, a inibição da miosinofosfatase, que efetivamente aumenta a fosforilação da CLM, pode ocorrer a uma concentração fixa de cálcio citoplasmático. Ou seja, às vezes o nível de Ca^{2+} nem sempre corresponde ao grau de fosforilação da cadeia leve da miosina e de contração do músculo liso, sendo que o nível de contração é maior do que seria esperado para um dado nível de Ca^{2+} . Os mecanismos independentes de Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e contração do músculo liso são conhecidos como sensibilização do Ca^{2+} (Kitazawa et al., 1988; Hashimoto et al., 2002b; Fukata et al., 2003; Chiba e Misawa, 2004; Sylvester, 2004).

Os mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que uma das principais vias envolvidas neste processo é a via RhoA/Rho quinase (Kureishi et al., 1977; Hirata et al., 1991; Hashimoto et al., 2002b; Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010). A Rho quinase ativada interfere com o equilíbrio entre as atividades da miosinoquinase e a miosinofosfatase, fosforilando e consequentemente inativando a subunidade de ligação da miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006). Como a miosinofosfatase remove fosfato da CLM

fosforilada para induzir o relaxamento muscular (Chiba et al., 2010), a inibição de sua atividade pela Rho quinase promove o estado fosforilado da CLM e contribui para um aumentado nível de contração (Schaafsma et al., 2004; Fernandes et al., 2006; Fernandes et al., 2007; Chiba et al., 2010).

Portanto, espera-se que o bloqueio da atuação da Rho quinase possa atenuar as respostas contráteis pela inibição do mecanismo de sensibilização do Ca^{2+} (Hashimoto et al., 2002b). O uso de inibidores da Rho quinase bloquearia sua atividade competindo com o local de ligação do ATP na enzima e preveniria a inibição da miosinofosfatase mediada pela RhoA, resultando em relaxamento da musculatura lisa (Uehata et al., 1997; Nagumo et al., 2000; Chiba et al., 2010). A Figura 9 mostra a representação esquemática da função da via Rho/Rho quinase na contração do músculo liso.

Figura 9. Representação diagramática da função da via Rho/Rho quinase na contração da musculatura lisa das vias aéreas. Abreviações: ROK, Rho quinase; GEF, fatores de troca guanina nucleotídeo; GAP, proteínas de ativação de GTPase; PLC, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; CLM, cadeia leve da miosina; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; IP3, inositol [1,4,5]-trifosfato; CaM, calmodulina; RS: retículo sarcoplasmático (Adaptado de Fernandes et al., 2009).

Além de participar no mecanismo de contração do músculo liso por meio de sensibilização do Ca^{2+} , contribuindo para a broncoconstrição presente na asma, a Rho quinase também tem outros papéis, incluindo adesão celular, organização do citoesqueleto da actina e mobilidade celular (Kaibuchi et al., 1999).

A Rho quinase é uma proteína com importante atuação sobre a inflamação (Henry et al., 2005). A via da Rho quinase participa em vários processos que constituem a inflamação das vias aéreas, incluindo migração,

quimiotaxia e infiltração das células inflamatórias para as vias aéreas (Schaafsma et al., 2008).

Os eosinófilos, uma fonte de fatores de crescimento, proteínas granulares, lipídios, citocinas e quimiocinas, estão associados à asma e suas características, incluindo acúmulo de muco, dano epitelial, disfunção de receptores de nervos colinérgicos nas vias aéreas, remodelamento e hiperresponsividade das vias aéreas (Kay et al., 2005; Watt et al., 2005). Já foi demonstrado *in vitro* que a quimiotaxia de eosinófilos induzida pela eotaxina está envolvida nos processos RhoA/Rho quinase (Adachi et al., 2001), e que o uso de inibidores de Rho quinase *in vivo* resulta na inibição do recrutamento de eosinófilos após desafios com antígeno (Henry et al., 2005), principalmente por meio de redução dos níveis de IL-5, IL-13 e eotaxina (Taki et al., 2007).

A inibição da Rho quinase também resulta em redução da liberação de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5 de células T periféricas ativadas em indivíduos normais (Aihara et al., 2003). Em indivíduos asmáticos, é capaz de reduzir a liberação de IL-2 e IL-5, porém fracamente reduz a liberação de IL-4 e IFN-gama. Esta variação sugere diferenças nos mecanismos subjacentes aos efeitos sobre a liberação de citocinas em indivíduos asmáticos (Aihara et al., 2004). De qualquer forma, embora não contribua positivamente no equilíbrio Th-2, o efeito antiinflamatório está presente, uma vez que a elevação de IFN- γ está relacionada ao aumento da responsividade das vias aéreas (Hacken et al., 1998) e aumento na produção de IL-4 contribui para o

excesso de produção de IgE e facilitando a inflamação alérgica em asmáticos (Kawano e Noma, 1995).

A ativação da Rho/Rho quinase está envolvida na migração transendotelial de monócitos, neutrófilos e na polarização e migração de linfócitos T, todas importantes células inflamatórias observadas na asma (Saito et al., 2002; Bardi et al., 2003; Honing et al., 2004; Fernandes et al., 2007).

Todas estas respostas fisiológicas induzidas pelos processos RhoA/Rho quinase podem estar relacionadas à limitação do fluxo aéreo, hiperreatividade das vias aéreas, infiltração eosinofílica para a parede das vias aéreas, e remodelamento das vias aéreas, que são parte da fisiopatologia da asma brônquica. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes a estes processos na asma brônquica (Taki et al., 2007).

De modo geral, o Y-27632 parece inibir o número de células inflamatórias totais para as vias aéreas, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos em cobaias sensibilizadas tratadas em relação aos controles (Schaafsma et al., 2008).

Além disso, a Rho quinase tem relação com as células dendríticas, que em indivíduos asmáticos, apresentam propriedades funcionais diferentes em relação às células de indivíduos não asmáticos (Upham e Stick, 2006). A Rho quinase tem função essencial na regulação da função das células dendríticas, incluindo mudanças na adesão e morfologia celular,

produção de interleucina-12 (IL-12) e interações com células T (Kobayashi et al., 2001).

Ainda não existem estudos avaliando a contribuição da Rho quinase sobre o remodelamento das vias aéreas e do parênquima pulmonar na inflamação pulmonar alérgica crônica, mas existem alguns estudos que apresentam resultados que sugerem a atuação da Rho quinase sobre o remodelamento. Um destes estudos demonstrou que a resposta proliferativa das células musculares lisas das vias aéreas ao ácido lisofosfatídico envolve a ativação da proteína Rho, implicando em uma função da via Rho/Rho quinase na proliferação de células do músculo liso das vias aéreas (Ediger et al., 2003).

A via da Rho quinase também pode contribuir para o espessamento da musculatura lisa das vias aéreas por meio de seus efeitos sobre a migração de miócitos, importante processo na reparação tecidual e remodelamento das vias aéreas. Os mecanismos pelos quais a via Rho/Rho quinase afeta a migração de células musculares lisas ainda não foram completamente elucidados, mas parecem envolver modulação da fosforilação da CLM e dinâmica da actina, que são eventos importantes no controle das respostas migratórias dos miócitos (Gerthoffer, 2007).

Outros estudos também demonstraram a participação da via Rho quinase na estimulação de proliferação celular de diferentes culturas de células, incluindo células de carcinoma pulmonar (Han et al., 2005). Estes resultados sugerem que a Rho quinase também possa estar envolvida na fibrose das vias aéreas.

Todos estes resultados tornam a via Rho/Rho quinase um possível alvo terapêutico para o tratamento de doenças obstrutivas como a asma brônquica e o seu inibidor demonstra uma grande efetividade em vários mecanismos envolvidos na resposta alérgica.

1.3 Justificativas do estudo

Diante destas informações acima apresentadas, o papel da Rho quinase parece estar envolvido em diversos aspectos da fisiopatogenia da asma, principalmente no que se refere à hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas, por meio da inibição aguda da Rho quinase em modelos agudos de inflamação pulmonar. Entretanto, ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos da inibição com doses repetidas de Rho quinase sobre a responsividade, resposta inflamatória, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo no parênquima pulmonar em modelos de inflamação pulmonar alérgica crônica. A compreensão do envolvimento da Rho quinase na asma é de fundamental importância para melhor compreensão sobre a fisiopatogenia da doença, bem como para avaliar o papel do inibidor da Rho quinase como um possível agente farmacológico para tratamento da asma.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram investigar os efeitos do tratamento com o inibidor específico da Rho quinase Y-27632 em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica, avaliando:

1. Alterações de mecânica oscilatória do parênquima pulmonar;
2. Alterações da matriz extracelular no parênquima pulmonar; conteúdo de fibras elásticas e de fibras colágenas;
3. Recrutamento eosinofílico no parênquima pulmonar;
4. Expressão de citocinas inflamatórias no parênquima pulmonar (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ);
5. Resposta de estresse oxidativo no parênquima pulmonar: expressão de iNOS, 8-iso-PGF2 α e NF- κ B;
6. Conteúdo de actina no parênquima pulmonar;
7. Expressão de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β no parênquima pulmonar;
8. Avaliar a correlação entre a Rt e a Et e os dados de citocinas inflamatórias, remodelamento e estresse oxidativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas neste estudo cobaias sadias do sexo masculino com três semanas de idade e pesando 300-350g inicialmente. Os animais receberam cuidado conforme o “guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH, 1985). Todos os protocolos e procedimentos descritos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (Protocolo de Pesquisa número 0250/09).

3.2 Grupos Experimentais

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

1. SAL: submetido a inalação de soro fisiológico 0,9%;
2. OVA: exposto a inalação com solução de ovoalbumina;
3. SAL-RHO: submetido a inalação de soro fisiológico e inalação de Y-27632 a partir da quinta inalação com de solução salina;
4. OVA-RHO: exposto a inalação de solução de ovoalbumina e inalação de Y-27632 a partir da quinta inalação de ovoalbumina.

3.3 Indução da Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica

A indução da inflamação pulmonar alérgica crônica foi realizada conforme descrito previamente (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2005a; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Ruiz Schütz et al., 2009). Em resumo, os animais foram colocados individualmente em uma caixa acrílica (30cm×15cm×20cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (Soniclear, São Paulo, Brasil) (Figura 10). Logo após, aerossol de solução de ovoalbumina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) diluída em soro fisiológico estéril a 0,9% (salina) era gerado por 15 minutos ou até o início de desconforto respiratório, definido pela presença de espirros, coriza, tosse e/ou tiragem da parede torácica. O tempo que a cobaia permanecia em contato com o aerossol foi denominado “tempo de inalação”. O protocolo de sete inalações foi realizado duas vezes por semana durante um período de 4 semanas, com a concentração de ovoalbumina sendo aumentada (1~5 mg/mL) para evitar tolerância. Nas primeiras quatro semanas (inalações 1-4), a dose de ovoalbumina usada foi 1 mg/mL. Na terceira semana (5^a e 6^a inalações), os animais receberam uma solução com 2,5 mg/mL de ovoalbumina. Na última semana do protocolo (quarta semana; 7^a inalação), a dose foi aumentada para 5 mg/mL de ovoalbumina. Os animais controle (grupos SAL e SAL-RHO) foram submetidos ao mesmo protocolo de inalações, mas com salina aerossolizada (Tibério et al., 1997).

Figura 10. Cobaia sendo submetida a inalação com o nebulizador ultrassônico acoplado à caixa acrílica.

3.4 Tratamento com Y-27632

A partir da quinta inalação do protocolo experimental, as cobaias foram expostas a 2 minutos de inalação de 1mM de Y-27632 (Tocris Bioscience, EUA), 10 minutos antes de cada inalação com ovoalbumina ou soro fisiológico, com base nos dados de um estudo prévio (Iizuka et al., 2000). Estes autores verificaram que 2 minutos de inalação com 1 mM de Y-27632 foi capaz de inibir o aumento da resistência pulmonar induzida por acetilcolina sem alterações na pressão arterial média. Estes autores usaram acetilcolina 10 minutos após a inalação de Y-27632 e verificaram que 1 hora após a inalação da droga seu efeito sobre a resistência pulmonar já estava presente. Uehata et al. (1997) encontraram que o Y-27632 pode diminuir a pressão arterial média em ratos hipertensos. No presente estudo, no dia da avaliação mecânica, a inalação com Y-27632 foi realizada até 1 hora antes do início do experimento. Foi optado por usar administração da droga via

inalação devido ao efeito direto sobre o sistema respiratório, bem como para a minimização de efeitos sistêmicos.

3.5 Avaliação da Mecânica oscilatória do tecido pulmonar

Setenta e duas horas da sétima inalação, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/Kg i.p.), traqueostomizados, submetidos à laparotomia para exsanguinação pela secção da veia cava inferior. O coração e os pulmões foram infundidos com solução de Krebs (em mM: NaCl, 118; KCl, 4.5; NaHCO₃, 25.5; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; glicose 10; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). As fatias de tecido pulmonar periférico serão obtidas da região subpleural do lobo inferior esquerdo medindo aproximadamente 10mm x 2mm x 2mm e serão mantidas em solução orgânica de Krebs, borbulhada continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (Carbogênio) em um pH de 7,40, após terem sido pesadas e seu comprimento de repouso (L0) medido (Lopez-Aguilar et al., 1998; Romero et al., 2001).

Cada uma das pontas do fragmento foi colada com cianocrilato a um pequeno clip metálico fixado em um longo fio de aço de 0,5mm de diâmetro e o conjunto foi suspenso verticalmente e mergulhado num banho de 15 ml de solução de Krebs, constantemente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, contido em um recipiente de vidro (Figura 11). De um lado, uma das pontas foi ligada a um transdutor de força (modelo 400A; Cambridge Technologies, Watertown, MA) que opera em torno de 10g, com uma resolução de 200µg e

uma complacência de $1\mu\text{g/g}$. A outra ponta atravessa um orifício na parte inferior do recipiente, onde foi colocada uma gota de mercúrio, pois sua alta tensão superficial previne a perda ou o extravasamento da solução de Krebs contida no recipiente, e será conectada a um braço oscilatório de controle de alterações de comprimento (L) (Modelo 300B; Cambridge Technologies). Este braço é capaz de determinar ponto a ponto, a excursão de 8mm e a resolução de $1\mu\text{m}$ de comprimento, que conectado a um gerador (Modelo 3030; BK Precision, Chicago, IL), controla a frequência, amplitude e a forma de onda da oscilação (Romero et al., 2001; Rocco et al., 2001; Xisto et al., 2005; Angeli et al., 2008) .

A tensão (T) é obtida através do movimento do parafuso que efetua pequenos deslocamentos do transdutor de força. Os sinais de comprimento e força foram captados e filtrados lentamente (*8-pole Bessel 902LPF; Frequency Devices, Haverhill, MA*) com uma frequência de 30Hz e convertidos em leitura analógica à digital por um conversor (*DT2801-A; Data Translation Inc, Marlborough, MA*) sendo então, gravados em um programa de computador.

O tecido foi submetido a uma força de 2g por três vezes retornando para uma força de 1 a 2g, com oscilação sinusoidal de 2,5% do comprimento inicial a uma frequência de 1Hz. Após 50 minutos de estabilização (com trocas de Krebs a cada 15 minutos), foram obtidos os dados de mecânica do tecido sob condições basais (por 5 minutos) e após desafio com ovalbumina a 0,1% no banho (por 10 minutos) para obtenção de uma resposta máxima.

Os valores de elastância (E) e resistência (R) do tecido foram estimados através da equação de movimento, descrita anteriormente:

$$T = E\Delta l + R(\Delta l / \Delta t) + K$$

onde T é tensão, l é comprimento, $\Delta l / \Delta t$ é a variação do comprimento por unidade de tempo e K é uma constante que reflete a tensão de repouso. Os resultados serão padronizados de acordo com o tamanho de cada fatia de tecido pulmonar. A área de secção transversal (A_0) da fatia de tecido pulmonar será obtida pela fórmula:

$$A_0(\text{cm}^2) = W_0 / (p \times L_r)$$

onde p é a densidade de massa do tecido adotado como 1.06 g/cm³, W_0 é o peso úmido em gramas, e L_r é a tensão em repouso em centímetros. Os valores de resistência (R) e elastância (E) serão multiplicados por L_r/A_0 . Será analisada a porcentagem de aumento da resistência (%R) e elastância (%E) em relação a condição basal (pré-desafio com OVA). Após a oscilação mecânica, as fatias de tecido pulmonar serão fixadas em formol 10% por 24 horas e embebidos em parafina para análise histológica (Nakashima et al., 2008; , Angeli et al., 2008; Reis et al., 2012).

Figura 11. Equipamento de avaliação da mecânica do parênquima pulmonar. (A) A fatia pulmonar subpleural retirada do pulmão esquerdo foi suspensa em um aparo contendo solução de Krebs, sendo submetida a uma oscilação constante por meio de um transdutor de força e de um braço oscilatório que controla a frequência, amplitude e forma da onda de oscilação. (B) Os dados de mecânica obtidos foram convertidos em sinal digital e por meio de um conversor, transformados em dados analógicos para a realização da análise.

3.6 Estudos Morfométricos

As fatias do parênquima pulmonar removidos foram fixadas com formol a 10% e após 24 horas, transferidos para etanol a 70%. Estas fatias foram processadas para incorporação da parafina. Cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram obtidos. Ao final de todas as colorações imunohistoquímicas, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia (Fischer, Darmstad, Alemanha).

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico com um retículo de retas e pontos (com 50 retas e 100 pontos), usando a técnica

de contagem de pontos (Weibel, 2010). Para a realização da contagem o retículo foi colocado no parênquima pulmonar (Figura 12).

Figura 12. Posicionamento do retículo no parênquima pulmonar para realização da técnica de contagem de pontos.

Para garantir a homogeneidade das fatias de tecido pulmonar periférico utilizada no presente estudo, foram analisadas as áreas fracionais de septo alveolar, da parede de vaso sanguíneo e da parede brônquica (proporção de estruturas), as quais foram determinadas pela técnica de pontos e retas. Para tanto, foram contados os pontos que coincidiam com cada uma dessas estruturas acima citadas, sendo então dividido pelo número total de pontos em cada campo. Esta análise foi feita em todos os campos possíveis de cada lâmina, em um aumento de 200x.

3.6.1 Quantificação de fibras colágenas e elásticas

As fatias do parênquima pulmonar também foram coradas com Picrosirius, um método para a identificação de colágeno e com o método Resorcina-fucsina de Weigert para identificação de fibras elásticas. De cada lâmina histológica, doze campos diferentes foram aleatoriamente selecionados para quantificar as fibras colágenas e elásticas. A quantificação foi realizada da mesma forma descrita acima. As fatias do parênquima pulmonar foram analisadas com aumento de 1000x e o volume de proporção de colágeno e fibras elásticas foi determinado dividindo o número de pontos coincidindo com fibras colágenas ou elásticas pelo número total de pontos coincidindo com a área de tecido no parênquima pulmonar. Os resultados foram expressos como porcentagem de fibras (Prado et al., 2005b; Angeli et al., 2008).

3.6.2 Quantificação de eosinófilos no tecido

Para a avaliação de eosinófilos, as fatias do parênquima pulmonar foram coradas com a coloração de Luna para grânulos de eosinófilos (Watanabe et al., 2004). Doze campos diferentes foram selecionados aleatoriamente de cada corte e foram analisadas com aumento de 1000x. O número de eosinófilos foi determinado pelo número de pontos que coincidiam com as células positivas dentro do retículo dividido pelo número

de pontos coincidindo com a área de tecido do parênquima pulmonar ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.6.3 Avaliação expressão celular de citocinas

Para a avaliação da expressão celular de citocinas, os cortes foram desparafinados e lavados 3 vezes por 10 minutos com H_2O_2 10V 3% para inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada com solução de citrato por 30 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpos anti-IFN- γ , anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5 e anti-IL-13 (todos da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) diluídos em albumina bovina sérica (BSA) nas proporções 1:50 (IFN- γ), 1:200 (IL-5 e IL-13), 1:400 (IL-2) e 1:500 (IL-4), e passaram a noite a 48°C. Um kit ABCVectastain (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, Carpinteria, EUA) foi usada como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisados doze campos de parênquima pulmonar por lâmina em um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas foi expresso como número de células/unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$) (Reis et al., 2012).

3.6.4 Avaliação da expressão celular de iNOS

Para a detecção da expressão celular de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a imunohistoquímica foi realizada pelo método biotina-estreptavidina peroxidase (LSAB) para anticorpo iNOS. Os cortes foram desparafinados e lavados 7 vezes por 5 minutos com H_2O_2 10V 3% para inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada por alta temperatura em solução de citrato com pH 6,00. Após este período, os cortes foram lavados em solução tampão salina (PBS) e incubados por toda a noite com anticorpo iNOS primário em diluição 1:400 (Lab Vision, Freemont, EUA). Os cortes foram então lavados em PBS e incubados com o kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA). Após isto, os cortes foram novamente lavados e 3,3 DAB (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) foi usada como cromógeno. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisados doze campos de parênquima pulmonar por lâmina em um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas para iNOS foi determinado pelo número de pontos que coincidiam com as células positivas dentro do retículo dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido do parênquima pulmonar ($10^4 \mu\text{m}^2$) (Angeli et al., 2008).

3.6.5 Avaliação da expressão tecidual de 8-isoprostano-PGF2 α

A coloração imunohistoquímica foi realizada usando anticorpo anti-8-epi-PGF2 α (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, EUA) na diluição 1:500. Os cortes foram desparafinados e lavados 7 vezes por 5 minutos com H₂O₂ 10V 3% para inibir a atividade da peroxidase endógena. Após as lavagens em PBS e água, a recuperação de antígeno foi realizada com tripsina por 20 minutos. Após isso, 3 lavagens em PBS foram realizadas por 3 minutos cada. Os cortes foram incubados com anti-8-epi-PGF2 α por toda a noite. Após lavagens em PBS, um kit ABCVectastain (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 DAB (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) foi usada como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises foram realizadas nos cortes corados para 8-isoprostano aplicando a mesma técnica de contagem de pontos descrita acima. A proporção de 8-iso-PF2 α na área do parênquima pulmonar foi dada pela relação entre o número de pontos coincidindo no 8-iso-PF2 α com a área total de tecido (aérea corada e não corada). Os cortes foram analisados em aumento 1000x e os resultados expressos em porcentagem (Angeli et al., 2008; Nakasima et al., 2008).

3.6.6 Avaliação da Expressão Celular de NF- κ B

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo NF- κ B foi utilizado o método LSAB. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H₂O₂ 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela de Pressão Pascal por 1 min a 125°, com tampão citrato pH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário NF- κ B (S Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), título 1:50, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1 hora) e complexo (30 minutos) pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) em estufa a 37°. Ao fim desta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Para finalizar a imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisadas três vias aéreas por pulmão a um aumento de 1000x como descrito acima. Foram analisados doze campos de parênquima pulmonar por lâmina em um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas para NF- κ B foi determinado pelo número de pontos que coincidiam com as células positivas dentro do retículo dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido do parênquima pulmonar (10⁴ μ m²).

3.6.7 Avaliação da expressão tecidual de actina

Para a detecção da actina, a imunohistoquímica foi realizada pelo método LSAB para a pesquisa dos marcadores anti-actina de musculatura lisa humana (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Os cortes histológicos foram desparafinados e posteriormente hidratados em banhos com álcool absoluto, 95° e 70°, por 1 minuto e lavados em água corrente abundante seguida de lavagem com água deionizada. Na sequência, os cortes foram lavados 7 vezes por 5 minutos com H_2O_2 10V 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Seguiu-se então a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura para o marcador Actina Músculo Liso em solução de citrato pH 6,0 por 30 minutos. Após este período, as lâminas imersas nesta solução foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em PBS, por três vezes. Antes da incubação do anticorpo primário foi realizado bloqueio de proteínas com leite desnatado a 2% por 10 minutos. Então as lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas pelo Kit LSAB Plus-HRP (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Foi usada 3,3 DAB (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) como cromógeno. Por fim, as lâminas foram abundantemente lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises foram realizadas aplicando a mesma técnica de contagem de pontos descrita anteriormente. A proporção de actina no parênquima pulmonar foi obtida pela relação entre o número de pontos coincidindo na actina com a

área total de tecido (aérea corada e não corada). Os cortes foram analisados em aumento 1000x e os resultados expressos em porcentagem.

3.6.8 Avaliação da expressão celular de MMP-9

A imunohistoquímica para pesquisa do anticorpo anti-MMP9 foi realizada pelo método LSAB. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas com banhos de álcool 70°, 95° e 100°. Em seguida, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada. Após isto, as lâminas foram lavadas em água corrente, água deionizada e PBS. Em seguida, a recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em panela de pressão por 50 minutos. Após este período, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água corrente, água deionizada e em PBS. Após os bloqueios, o anticorpo primário monoclonal MMP-9 (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi diluído em BSA 1:500, aplicado sobre os cortes e as lâminas incubadas por toda a noite. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), lavadas em PBS e reveladas pelo cromógeno 3,3 DAB (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). As lâminas foram então lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisados doze campos de parênquima pulmonar por lâmina em um aumento de 1000x como descrito acima. O

número de células positivas foi expresso como células/unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$).

3.6.9 Avaliação da expressão celular de TIMP-1

A imunohistoquímica utilizada para a pesquisa do anticorpo TIMP-1 foi realizada pela enzima peroxidase. Os cortes silanizados foram desparafinados e hidratados com banhos de álcool a 70°, 95° e 100°, seguidos por lavagem das lâminas em água corrente. Depois disso, as lâminas foram mergulhadas em ácido fórmico por 3 minutos, e novamente lavadas em água corrente e água destilada. Para a recuperação antigênica, obtida através de alta temperatura em panela de pressão Pascal, foi usado tampão citrato pH 6,0 por 1 minuto. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e PBS. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10V 3% e metanol vol/volume por 10 minutos e depois somente com H_2O_2 10V 3% por 3 vezes de 5 minutos cada. As lâminas foram então novamente lavadas água corrente, água destilada e PBS. Após os bloqueios, o anticorpo monoclonal TIMP-1 (Lab Vision/NeoMarkers, Freemont, EUA) diluído em BSA 1:50 foi aplicado sobre os cortes e as lâminas incubadas por toda a noite, de 2° a 8°, por no mínimo 12h. As lâminas foram então lavadas em PBS e incubadas pelo kit Novolink Novocastra (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e o cromógeno 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA) foi usado para revelação. Por fim, as lâminas foram lavadas

abundantemente com água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisados doze campos de parênquima pulmonar por lâmina em um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas foi expresso como células/unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.6.10 Avaliação da expressão celular de TGF- β

A coloração imunohistoquímica para a pesquisa do anticorpo anti-TGF beta foi realizada pelo método LSAB. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas, e seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada. Em seguida, foi realizada a lavagem em água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em panela de pressão Pascal. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS. Após os bloqueios, o anticorpo primário TGF- beta (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) foi diluído em BSA em diluição 1:1500, aplicado sobre os cortes e as lâminas incubadas por toda a noite. Após este período, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas pelo kit Novolink Novocastra (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Por fim, as lâminas foram abundantemente lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisados doze campos de parênquima pulmonar por

lâmina em um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas foi expresso como células/unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.7 Anafilaxia cutânea passiva (ACP)

Para a titulação de anticorpos IgE e IgG1 foi utilizada a técnica de Ovary (1964), modificada por Mota e Perini (1970). Quatro cobaias de cada grupo foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50mg/kg ip), e 5 mL de sangue foram retirados por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado a 1000 rotações por vinte minutos numa temperatura de 4°C. Para a titulação de IgG1, uma parte do soro foi aquecida em banho maria a 56° C por uma hora, para inativar os anticorpos IgE.

Para obter a ACP, o dorso das cobaias foi tricotomizado, tomando-se o cuidado de não irritar a pele. No tecido subcutâneo dorsal das cobaias foi injetado 0,1 ml de cada concentração de soro (de 1:5 até 1:2560).

Após vinte e quatro horas para IgG1 e quatro dias para IgE, foi injetada na corrente sangüínea uma solução contendo 1 mg de ovoalbumina, 1ml de azul de Evans e 0,25% de solução salina. Depois de trinta minutos os animais foram sacrificados, sua pele retirada e invertida e o diâmetro das reações foi analisado, considerando-se positiva a reação com diâmetro maior que cinco milímetros. A titulação foi determinada pela maior diluição de soro capaz de induzir uma reação de anafilaxia cutânea passiva.

3.8 Análise estatística

Todos os dados representam média $\pm$ erro padrão (EP), e os gráficos são apresentados na forma de barras. A significância estatística da diferença entre os grupos foi determinada por análise de variância simples (ANOVA) seguida pelo método de Holm-Sidak para comparações múltiplas. Foi realizada a análise de correlação e obtido o coeficiente de Pearson (R) para avaliar as associações dos escores de Rt e Et com os marcadores de células inflamatórias, remodelamento e estresse oxidativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, EUA). As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da mecânica do parênquima pulmonar

A porcentagem de aumento máximo da resistência tecidual (Rt) é mostrado na Figura 13. Houve um aumento significativo da porcentagem de Rt no grupo OVA ($42,26 \pm 4,1\%$) comparado aos grupos controles (SAL: $6,73 \pm 2,6\%$ e SAL-RHO: $8,38 \pm 1,7\%$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor da Rho quinase atenuou esta resposta (OVA-RHO: $20,8 \pm 5,7\%$, $P < 0,001$).

Figura 13. Média $\pm$ erro padrão da porcentagem máxima de aumento na resistência tecidual (Rt) obtida após desafio com ovoalbumina (0,1%) ou soro fisiológico. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA.

A porcentagem de aumento máximo da elastância tecidual (Et) é mostrado na Figura 14. Também houve aumento significativo da %Et no grupo OVA ($51,0 \pm 10,7\%$) comparado aos grupos controles (SAL: $3,85 \pm 0,9\%$;

SAL-RHO: $5,33 \pm 1,2\%$, $P < 0,001$). O tratamento com o inibidor da Rho quinase reduziu esta resposta comparado ao grupo OVA (OVA-RHO: $20,75 \pm 6,0\%$; $P < 0,001$).

Figura 14. Média $\pm$ erro padrão da porcentagem máxima de aumento na elastância tecidual (Et) obtida após desafio com ovoalbumina (0,1%) ou soro fisiológico. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA.

4.2 Análises morfométrica

Não houve diferença na composição anatômica (alvéolos, vasos e vias aéreas) nos fragmentos do parênquima pulmonar. Na análise estes fragmentos mostraram uma composição aproximadamente de 90% de alvéolos (SAL: $90,0 \pm 1,30\%$, OVA: $90,9 \pm 0,56\%$, SAL-RHO: $91,48 \pm 0,83\%$, OVA-RHO: $91,7 \pm 0,99\%$).

4.2.1 Efeitos da inibição da Rho quinase na inflamação eosinofílica

A Figura 15 mostra os valores da quantificação de eosinófilos no

parênquima pulmonar nos quatro grupos experimentais. Foi observado que houve um aumento na quantidade de eosinófilos nas cobaias expostas a ovoalbumina (OVA: $4,39 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos controles (SAL: $0,85 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-RHO: $0,77 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O tratamento com o inibidor da Rho quinase reduziu o número destas células no parênquima pulmonar nos animais expostos a inalação de ovoalbumina (OVA-RHO: $1,78 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente aos animais não tratados ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 15. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão dos valores de densidade de eosinófilos no parênquima pulmonar dos quadros grupos experimentais. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL-RHO. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para eosinófilos nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

4.2.2 Efeitos da inibição da Rho quinase nas citocinas inflamatórias

A Figura 16 mostra o número de células positivas para IL-2 para todos os grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-2 no parênquima pulmonar dos animais expostos a ovoalbumina não tratados (OVA: $17,67 \pm 1,65$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos expostos a inalação com solução salina (SAL: $2,07 \pm 0,47$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e SAL-RHO: $2,13 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-2 no grupo exposto a OVA e tratado com Y-27632 foi reduzido (OVA-RHO: $7,36 \pm 0,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 16. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para IL-2 nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

A Figura 17 representa o número de células positivas para IL-4 no parênquima pulmonar para todos os grupos experimentais. Houve um aumento de células positivas para IL-4 no tecido pulmonar de animais do grupo OVA ($17,88 \pm 1,76$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados com os grupos SAL ($1,85 \pm 0,48$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL-RHO ($2,19 \pm 0,57$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas no grupo OVA-RHO ($9,25 \pm 1,13$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 17. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-4 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para IL-4 nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

A Figura 18 representa o número de células positivas para IL-5 no parênquima pulmonar em todos os grupos experimentais. Houve um aumento de células positivas para IL-5 no parênquima pulmonar dos animais do grupo OVA ($11 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados com os animais dos grupos SAL ($1,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL-RHO ($2,2 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $P < 0,001$. O número de células positivas no grupo OVA-RHO ($3,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 18. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-5 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para IL-5 nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

As células positivas para IL-13 no parênquima pulmonar em todos os grupos experimentais podem ser observadas na Figura 19. Houve um aumento de células positivas para IL-13 no parênquima pulmonar dos animais do grupo OVA ($9,0 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados com os grupos SAL ($2,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL-RHO ($3,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), $P < 0,001$. O número de células positivas no grupo OVA-RHO ($5,3 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 19. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-13 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para IL-13 nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

Também foi observado (Figura 20) um aumento do número de células positivas para IFN- γ no parênquima pulmonar entre os animais expostos a inalações de ovoalbumina não tratados (OVA: $27,58 \pm 2,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos animais dos grupos controles (SAL: $10,34 \pm 1,13$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e SAL-RHO: $11,62 \pm 0,93$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ao grupo tratado com o inibidor da Rho quinase (OVA-RHO: $18,28 \pm 0,86$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), para o qual foi observado atenuação das células positivas para IFN- γ ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 20. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IFN- γ no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para IFN- γ nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

4.2.3 Efeitos da inibição da Rho quinase no remodelamento pulmonar

O volume de proporção de fibras elásticas é mostrado na Figura 21. O conteúdo de fibras elásticas foi maior nos grupos de animais expostos a ovoalbumina (OVA: $17,56 \pm 0,9\%$ e OVA-RHO: $13,0 \pm 1,4\%$) comparado às cobaias expostas a salina (SAL: $9,86 \pm 0,5\%$ e SAL-RHO: $9,28 \pm 0,6\%$, $P < 0.001$). Os animais sensibilizados tratados com Y-27632 apresentaram menor conteúdo de fibras elásticas comparado aos animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA, $P < 0,001$).

Figura 21. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar dos quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando o conteúdo de fibras elásticas nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

A Figura 22 mostra que houve aumento no conteúdo de colágeno no parênquima pulmonar das cobaias expostas a ovoalbumina (OVA: $19,45 \pm 0,8\%$ e OVA-RHO: $11,64 \pm 0,9\%$) comparado aos grupos expostos a soro fisiológico (SAL: $7,45 \pm 0,5\%$ e SAL-RHO: $9,22 \pm 0,7\%$). O tratamento com Y-27632 também atenuou o conteúdo de fibras colágenas nos animais expostos a ovoalbumina em relação aos não tratados ($P < 0,001$).

Figura 22. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras colágenas no parênquima pulmonar dos quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando o conteúdo de fibras colágenas nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

Na Figura 23 é possível observar que também houve aumento no conteúdo de actina no parênquima pulmonar das cobaias expostas a ovoalbumina (OVA: $11,17 \pm 0,4\%$) comparado aos grupos que foram expostos a soro fisiológico (SAL: $4,36 \pm 0,3\%$ e SAL-RHO: $5,65 \pm 0,4\%$). O tratamento

com Y-27632 também atenuou o conteúdo de actina nos animais expostos a ovoalbumina em relação aos não tratados (OVA-RHO: $5,40 \pm 0,4\%$; $P < 0,001$).

Figura 23. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do conteúdo de actina no parênquima pulmonar dos quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando o conteúdo de actina nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

4.2.4 Efeitos da inibição da Rho quinase no estresse oxidativo

A Figura 24 representa a média do número de células positivas para iNOS no parênquima pulmonar. Houve um aumento significativo da expressão de células positivas para iNOS no grupo OVA ($8,65 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado com os controles SAL ($2,34 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL-RHO ($2,51 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com $P < 0,001$. O grupo OVA-RHO

($5,78 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) teve uma redução significativa no número de células positivas para iNOS comparado com o grupo OVA ($P < 0,001$).

Figura 24. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para iNOS no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA. Não houve diferenças entre o grupo SAL e SAL-RHO. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para iNOS nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

Na Figura 25 podemos observar a representação do volume proporcional de 8-iso-PGF2 α no parênquima pulmonar. Os animais do grupo OVA ($15,26 \pm 1,2\%$) apresentaram valores maiores de densidade de 8-iso-PGF2 α em relação aos grupos SAL ($3,69 \pm 0,3\%$) e SAL-RHO ($4,46 \pm 0,4\%$), com $P < 0,001$. Os animais do grupo OVA-RHO ($11,98 \pm 0,4\%$) apresentaram menor conteúdo de 8-iso-PGF2 α em relação ao grupo OVA ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 25. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do conteúdo de 8-iso-PGF2 α no parênquima pulmonar dos quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando o conteúdo de 8-iso-PGF2 α nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

Podemos observar na Figura 26 o número de células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar em todos os grupos experimentais. Houve um aumento de células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar dos animais do grupo OVA ($16,41 \pm 1,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados com os grupos SAL ($3,72 \pm 0,31$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL-RHO ($3,7 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas no grupo OVA-RHO ($9,0 \pm 1,06$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 26. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA. Não houve diferenças entre o grupo SAL e SAL-RHO. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para NF- κ B nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

4.2.5 Efeitos na expressão celular de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β

Podemos observar na figura 27 que houve um aumento significativo no número de células positivas para MMP-9 no parênquima pulmonar do grupo OVA ($26,3 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos controles (SAL: $13,12 \pm 0,94$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e SAL-RHO: $13,52 \pm 1,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O número de células positivas no grupo OVA-RHO (OVA-RHO: $16,98 \pm 0,84$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 27. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-9 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA. Não houve diferenças entre o grupo SAL e SAL-RHO. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para MMP-9 nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

A Figura 28 mostra o número de células positivas para TIMP-1 para todos os grupos experimentais. Também houve um aumento de células positivas para TIMP-1 no parênquima pulmonar dos animais do grupo OVA ($14,15 \pm 1,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados com os grupos SAL ($4,5 \pm 0,83$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e SAL-RHO ($4,43 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas no grupo OVA-RHO ($10 \pm 0,62$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 28. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TIMP-1 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA. Não houve diferenças entre o grupo SAL e SAL-RHO. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para TIMP-1 nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

O número de células positivas para TGF- β é mostrado na Figura 29. Foi observado um aumento de células positivas no parênquima pulmonar para TGF- β no tecido pulmonar de animais do grupo OVA ($13,24 \pm 0,77$ células/ $104 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos de animais expostos a salina (SAL: $4,9 \pm 0,75$ células/ $104 \mu\text{m}^2$ e SAL-RHO: $4,57 \pm 0,58$ células/ $104 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O número de células positivas no grupo OVA-RHO ($6,87 \pm 0,49$ células/ $104 \mu\text{m}^2$) foi significativamente menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos SAL e SAL-RHO.

Figura 29. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo OVA. Não houve diferenças entre o grupo SAL e SAL-RHO. Fotomicrografia do parênquima pulmonar mostrando as células positivas para TGF- β nos grupos SAL, OVA, SAL-RHO e OVA-RHO, com aumento de 400x.

4.3 Análise de correlação

A tabela 3 mostra a análise de correlação da Rt e da Et em relação a expressão celular de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ) e eosinófilos, aos marcadores de remodelamento (Fibras colágenas e elásticas, actina, TGF- β , MMP-9 e TIMP-1) e marcadores de estresse oxidativo (iNOS, NF- κ B e 8-iso-PGF2 α). Foram observadas correlações fortes e significativas entre todos os parâmetros avaliados.

Tabela 3. Correlação de Pearson de Rt e Et em relação aos marcadores inflamatórios (a), de remodelamento (b) e estresse oxidativo (c).

(a)

	Rt Valor R Valor p	Et Valor R Valor p
Eosinófilos	0,71 0,000213	0,425 0,0487
IL-2	0,769 0,0000289	0,519 0,0134
IL-4	0,903 0,0000861	0,543 0,00898
IL-5	0,795 0,0000969	0,451 0,035
IL-13	0,59 0,00387	0,356 0,0104
IFN-γ	0,795 0,0000994	0,515 0,0142

(b)

	Rt Valor R Valor p	Et Valor R Valor p
Fibras Colágenas	0,519 0,0133	0,357 0,0103
Fibras Elásticas	0,774 0,0000235	0,532 0,0108
Actina	0,625 0,00185	0,485 0,0221
TGF-β	0,813 0,0000426	0,585 0,00424
MMP-9	0,745 0,0000702	0,439 0,0411
TIMP-1	0,791 0,0000115	0,569 0,00576

(c)

	Rt Valor R Valor p	Et Valor R Valor p
iNOS	0,577 0,00493	0,309 0,0162
NF-κB	0,841 0,0000958	0,463 0,0302
8-iso-PGF2α	0,83 0,00000182	0,48 0,0237

4.4 Efeitos na anafilaxia cutânea passiva (ACP)

A anafilaxia cutânea passiva evidenciou aumento nos anticorpos anafiláticos específicos IgG1 entre as cobaias expostas às inalações com ovoalbumina (grupo OVA, titulação máxima de 1:640). Não houve detecção de anticorpos IgG1 nos grupos SAL e SAL-RHO. Esta resposta foi reduzida entre os animais sensibilizados e tratados com Y-27632 (grupo OVA-RHO, titulação máxima de 1:160). Não houve reação positiva aos anticorpos IgE.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a inibição da Rho quinase por intermédio do inibidor Y-27632 atenuou a responsividade do parênquima pulmonar após o desafio com antígeno. Este resultado correlacionou-se com a redução do conteúdo de eosinófilos, da expressão de citocinas inflamatórias de perfil Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IL5, IL-13 e IFN- γ), com o remodelamento da matriz extracelular, avaliada pela redução do conteúdo de actina, fibras colágenas e elásticas e também com a expressão de células positivas para MMP-9, TIMP-1, NF κ B e TGF- β . Complementando estes achados, houve uma significativa atenuação na ativação da via de estresse oxidativo, observada por meio da diminuição do número de células positivas para iNOS e do conteúdo do 8-iso-PGF2 α no parênquima pulmonar distal neste modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

Os modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias são considerados um dos mais apropriados para avaliação do processo de remodelamento pulmonar em relação aos modelos de inflamação aguda de exposição ao antígeno em animais imunizados (Ricciardolo et al.,2008; Tibério et al.,1997). Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que este modelo experimental apresenta algumas características importantes da fisiopatologia da asma, tais como uma intensa constrição, inflamação eosinofílica e remodelamento da matriz extracelular do parênquima pulmonar (Angeli et al.,2008; Starling et al.,2009). Além disso, os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram menor

período de tempo em contato com o antígeno durante as inalações (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2005; Prado et al., 2005a). Todos esses resultados prévios se confirmam neste presente estudo.

O tratamento com o inibidor da Rho quinase (Y-27632) foi iniciado a partir da quinta inalação para que não ocorresse interferência com o processo de sensibilização. Neste tempo, como já previamente demonstrado, as cobaias já estão sensibilizadas e mostram um aumento na IgG1 detectados através da técnica de anafilaxia cutânea passiva (Tibério et al., 1997). Esta elevação de anticorpos específicos IgG1 em grupos expostos à ovoalbumina foi também demonstrada neste estudo (grupo OVA: 1/640). Embora o tratamento com o inibidor da Rho quinase induziu a redução nos anticorpos específicos IgG1, os animais apresentavam ainda significativa titulação de anticorpos anafiláticos (grupo OVA-RHO:1/160).

Com a possibilidade de que todos os resultados encontrados neste estudo possam ser decorrentes de um efeito agudo da última inalação, nos baseamos na pesquisa desenvolvida por Possa et al. (2012), que utilizou o mesmo protocolo de sensibilização e de tratamento deste estudo, demonstrando que, mesmo sem a administração da última inalação com o inibidor da Rho quinase no protocolo experimental, houve uma diminuição da responsividade e da inflamação eosinofílica das vias aéreas. Portanto, no presente estudo decidimos manter o protocolo com a última inalação com o inibidor da Rho quinase.

As propriedades mecânicas do parênquima pulmonar são os maiores determinantes da função fisiológica pulmonar e desempenham um

importante papel na fisiopatologia da asma, principalmente nos pacientes asmáticos severamente afetados (Dolhnikoff et al., 1988). Um estudo de Lanças et al. (2006) demonstrou que em cobaias expostas a repetidas inalações com ovoalbumina ocorre um aumento nas respostas de resistência e elastância do parênquima pulmonar na fase aguda e tardia pós-desafio com ovoalbumina. Estas respostas estiveram associadas à inflamação eosinofílica e remodelamento da matriz extracelular, principalmente no que diz respeito ao aumento do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar periférico.

Recentemente, utilizando o mesmo modelo de asma experimental, demonstramos que houve uma significativa atenuação na mecânica oscilatória do parênquima pulmonar, da inflamação eosinofílica e do remodelamento da matriz extracelular em animais tolerizados quando comparados a animais somente expostos à ovoalbumina (Nakashima et al., 2008).

Corroborando com os dados deste estudo, além de intensa inflamação encontrada no parênquima pulmonar, 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 patogênese de anormalidades funcionais observadas em pacientes com asma.

A inibição da Rho quinase atenuou as respostas máximas de resistência e elastância teciduais pós-desafio com antígeno comparado a animais sensibilizados e não tratados. Nós também demonstramos que a inibição da Rho quinase atenuou o conteúdo de actina, previamente aumentada pelo processo de sensibilização. Possíveis conclusões destes dados sugerem que a Rho quinase tem um papel constritor no parênquima pulmonar, provavelmente devido a uma intervenção na função da actina, presente em elementos miocontráteis e estrutura celular, especialmente nos miofibroblastos localizados no parênquima pulmonar (Suki et al.2005). Isto sugere que os efeitos na actina estão envolvidos com a sensibilização do Ca^{2+} , com a inibição da miofosfatase e com a fosforilação da cadeia leve da miosina (Heasman et al.,2010).

A sensibilização do Ca^{2+} aumenta a tensão do músculo liso e a fosforilação da 20-kDA, cadeia reguladora leve da miosina (MLC_{20}) em uma concentração contante de Ca^{2+} (Yoshii et al.,1999). Esta sensibilização do Ca^{2+} nas propriedades do músculo liso é mediada por uma pequena proteína G, RhoAp21, e sua proteína-alvo, a Rho quinase (Uehata et al., 1997). Estas estruturas são especialmente importantes durante a fase sustentada da contração do músculo liso (Yoshii et al., 1999).

Avaliando as respostas funcionais de contratilidade da musculatura lisa, Schaafsma et al. (2008) verificaram os efeitos do pré-tratamento com o inibidor da Rho quinase (Y-27632) na diminuição das respostas aguda e tardia induzida por alérgeno (ovoalbumina). Estes autores mostraram uma considerável proteção contra o desenvolvimento de hiper-responsividade

das vias aéreas nas duas respostas, sugerindo um efeito de relaxamento deste inibidor.

Matsumoto et al. (2007), verificaram um aumento da contração de células musculares lisas embebidas em gel de colágeno nas vias aéreas de pacientes asmáticos provocado por histamina. A contração destas células foi inibida quando estes mesmos pesquisadores utilizaram o inibidor específico da Rho quinase (Y-27632).

Em um estudo de Fernandes et al. (2006) constatou-se que o Y-27632 reduz as contrações mediadas por nervos colinérgicos em preparações traqueais de cobaias e camundongos de forma dose-dependente. Entretanto, assim como os broncodilatadores β 2-adrenérgicos, o Y-27632 aumenta a liberação de neurotransmissor dos nervos colinérgicos das vias aéreas. Os possíveis mecanismos responsáveis por este aumento de liberação de neurotransmissor ainda não são claros (Zhang et al., 1995; Fernandes et al., 2006).

Henry et al. (2005) concluíram que o aumento na resistência das vias aéreas induzido por metacolina em ratos alérgicos também foi reduzido com a administração intranasal de Y-27632, pelo menos até oito horas após a instilação do inibidor da Rho quinase. Em outro estudo de Witzernath et al. (2008) verificaram que o uso de Y-27632 em camundongos sensibilizados com ovalbumina foi capaz de atenuar a contratilidade das vias aéreas provocada por metacolina nos pulmões sensibilizados.

É importante esclarecer que em todos os estudos acima citados, os autores realizaram uma inibição aguda da Rho quinase. Em relação ao

tratamento crônico com o inibidor da Rho quinase, Possa et al. (2012) demonstraram que com a utilização de doses repetidas do Y-27632 houve uma diminuição da resistência e elastância do sistema respiratório, mas sua ação no parênquima pulmonar não foi avaliada.

Acreditamos que a inibição repetida da Rho quinase foi relevante no sentido de esclarecer a potencial importância deste inibidor no tratamento da asma e que o estudo da resposta do parênquima distal complementa de forma imprescindível a compreensão da modulação de resposta funcional nesta doença.

Vários estudos indicam que a inflamação presente nas vias aéreas distais e no parênquima pulmonar tem um papel importante na função pulmonar de pacientes com asma (Haley et al., 1998; Hamid et al., 1997). Kraft et al. (2007) sugeriram que a melhora na inflamação, nos sintomas e na função pulmonar dos pacientes com asma noturna estava relacionada com a capacidade de alcance dos corticosteroides na região do parênquima pulmonar, local muitas vezes de limitado acesso para a deposição efetiva de drogas inalatórias.

Em relação à infiltração eosinofílica, confirmamos dados anteriores que mostraram que no parênquima pulmonar distal de animais sensibilizados com ovoalbumina há um aumento no número destas células (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009). Também podemos notar que o inibidor da Rho quinase foi capaz de atenuar esta resposta nos animais sensibilizados.

Apesar da ação da via Rho/Rho quinase sobre o recrutamento dos eosinófilos ainda não estar bem definida, o estudo de Adachi et al. (2001), em que foram avaliados os eosinófilos isolados em sangue periférico de humanos após a administração do inibidor da Rho quinase (Y-27632), demonstrou que o uso deste inibidor reduz a eosinofilia em decorrência da diminuição da sinalização pela eotaxina, no entanto, o mecanismo de ação deste inibidor sobre a eotaxina não foi avaliada.

Além disso, no presente estudo mostramos que este mesmo inibidor (Y-27632) atenuou o número de células positivas para a expressão de IL2, IL4, IL5, IL-13 e IFN- γ . Taki et al. (2007) estudaram os efeitos do tratamento com Fasudil, um inibidor pouco específico da Rho quinase, avaliando a eosinofilia e hiper-responsividade nas vias aéreas em camundongos sensibilizados. Os autores encontraram uma diminuição dose-dependente do recrutamento eosinofílico, nos níveis de IL5, IL-13 e eotaxina. Estes resultados sugerem que a inibição da Rho quinase modula os eventos de sinalização envolvidos no recrutamento de eosinófilos em resposta a uma inflamação alérgica.

Aihara et al. (2004) mostraram que o Y-27632 suprimia a liberação de citocinas Th1 e parcialmente de citocinas de perfil Th2 em pessoas saudáveis. Em pacientes asmáticos, reduziu tanto a liberação de IL-2 e IL-5 quanto a liberação de IL-4 e IFN- γ , porém de forma mais atenuada nas últimas.

No presente estudo, a inibição da Rho quinase foi associada com significativa redução de aproximadamente 50% da expressão de citocinas

inflamatórias nos animais sensibilizados com ovoalbumina, indicando que existe de fato uma associação entre a via Rho/Rho quinase e a liberação destes mediadores. É importante considerar que os efeitos mais importantes foram notados na expressão celular para IL-5.

No que diz respeito às alterações no remodelamento da matriz extracelular, particularmente na avaliação do conteúdo de fibras colágenas e elásticas, houve uma significativa redução no conteúdo destas fibras em animais sensibilizados tratados com o Y-27632.

Embora haja evidência de que este modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica é associado com aumento do conteúdo de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, não encontramos estudos experimentais prévios avaliando o papel da inibição da Rho quinase nas respostas de remodelamento no processo fisiopatológico da asma, principalmente no que diz respeito ao parênquima pulmonar (Angeli et al., 2008; Mauad et al., 1996 e 2003; Nakashima et al., 2008; Richards et al., 2001; Xisto et al., 2005).

O remodelamento tecidual resulta de um processo de reparo em resposta a uma inflamação persistente, ativado por mediadores pró-inflamatórios, metaloproteinases, citocinas e fatores de crescimento (Vignola et al., 2003). Zhou et al. (2011) analisaram os efeitos do Fasudil na proliferação de fibroblastos cardíacos bem como na síntese de colágeno, induzidas por altas doses de glicose. Os autores mostraram que a ativação da Rho quinase é fundamental para a síntese de colágeno, o que pode estar relacionado a uma combinação de fatores, incluindo a inibição das vias da

proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK) e de TGF- β , ambas envolvidas nos processos de fibrose. Além disso, neste estudo, a redução do número de células inflamatórias, pela inibição da Rho quinase através do inibidor Y-27632, ajudou a prevenir a inflamação crônica e, indiretamente, contribuiu para a redução do remodelamento, o que pode ser evidenciado pelo menor conteúdo de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar.

Kondrikov et al. (2011) investigaram as funções da Rho quinase e das espécies reativas de oxigênio (ROS) na síntese de colágeno tipo I em fibroblastos de pulmões humanos e de camundongos expostos a hiperóxia em um modelo de toxicidade por oxigênio. Os autores concluíram que a toxicidade por oxigênio induz a ROS a separar o inibidor de dissociação guanina- nucleotídeos (GDI, um regulador da atividade da Rho GTPase) da Rho quinase, levando à ativação da via Rho quinase e contribuindo para o aumento na síntese de colágeno tipo I.

A inibição da iNOS reduz MMP-9, TIMP-1 e TGF- β na parede vascular brônquica de animais sensibilizados com ovoalbumina. Além da redução da iNOS, no presente estudo também observamos a atenuação dos níveis de MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta entre os animais sensibilizados tratados com inibidor da Rho quinase. Todos esses mediadores atuam na produção de colágeno e fibras elásticas, contribuindo para o remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas (Prado et al., 2011). O nível reduzido de células positivas para iNOS com a inibição da Rho quinase encontrado no presente estudo, bem como o reduzido conteúdo de fibras colágenas e elásticas nos grupos tratados, podem ser provavelmente devido a esta via. O

número reduzido de iNOS quando a Rho quinase é inibida está de acordo com outros estudos, embora os mecanismos subjacentes não sejam claros (Soliman et al., 2008; McGown et al., 2011).

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas capazes de degradar virtualmente todos os componentes da matriz extracelular (Shipley et al., 1996). Além da sua potencial participação na inflamação, a MMP-9 desempenha um papel importante no processo de remodelamento tecidual. As células inflamatórias como os eosinófilos, células T e também algumas células estruturais como as células do músculo liso são capazes de causar mudanças estruturais irreversíveis devido à secreção e produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que podem ser ativados ou inativados por clivagem proteolítica resultante da atividade das MMPs (Mott et al., 2004).

As células Th2 e a liberação de TGF- β estão envolvidas nos processos inflamatórios, e alguns destes mediadores interagem diretamente com as MMPs e TIMPs conduzindo tanto a uma regulação da sua expressão quanto a mudanças nas suas atividades biológicas por clivagem proteolítica (Gueders et al., 2005). Outro nível de controle para a atividade da MMP-9 é a sua inibição por intermédio de inibidores endógenos, como o TIMP-1. No que diz respeito à MMP-9 e TIMP-1, sua expressão em tecidos é estreitamente regulada a fim de manter o equilíbrio entre proteólise e a inibição da proteólise da matriz extracelular (Goldberg et al., 1992).

Neste estudo, mostramos que houve um aumento na MMP-9 e TIMP-1 no grupo OVA. É importante ressaltar que o inibidor específico da MMP-9,

o TIMP-1, é reconhecido como portador de efeitos biológicos independentes das MMPs, tal como induzir apoptose celular (Kelly et al., 2000). Além disso, podemos especular que juntos estes resultados favorecem um processo de degradação/reparação nas fibras colágenas e elásticas da matriz extracelular.

A redução nos níveis de células positivas para iNOS, MMP-9, TIMP-1 e TGF- β por meio da inibição da Rho quinase no presente estudo, e a diminuição do conteúdo de fibras colágenas e elásticas nos grupos tratados são provavelmente devido à inibição desta via. A redução do número de iNOS, MMP-9, TIMP-1 e TGF- β quando a Rho quinase é inibida, está em concordância com os resultados de outros estudos (Hasan et al., 2012).

No entanto, estudos futuros são necessários para esclarecer exatamente os mecanismos de ação do Y-27632 no óxido nítrico e no estresse oxidativo.

Avaliando a importância da ativação do estresse oxidativo, também demonstramos uma atenuação no número de células positivas para iNOS e do conteúdo de isoprostano (8-iso-PGF 2α) em animais sensibilizados e tratados com o Y-27632. Já está claramente demonstrado, que a ativação da iNOS pode contribuir para a formação de peroxinitrito, que é um agente oxidante formado pela interação do NO e o superóxido. Subsequentemente, a geração de isoprostano pode resultar na peroxidação lipídica induzida por formação de peroxinitrito (Hickman-Davis et al., 1999; Mong et al., 2009).

A inibição da Rho quinase na ativação do estresse oxidativo pode ter contribuído para atenuar a responsividade do parênquima pulmonar. Não há

estudos prévios analisando os efeitos da inibição da Rho quinase na ativação do estresse oxidativo, mas especulamos que a redução nos eosinófilos e das respostas de expressão de citocinas Th2 pode ser responsável por estas descobertas como demonstrada em outros estudos (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

Além disso, a redução da via do estresse oxidativo devido ao tratamento com o inibidor da Rho-quinase pode também ter contribuído para a atenuação do remodelamento da matriz extracelular. A este respeito, Prado et al. (2011) mostraram que a inibição da iNOS reduz MMP-9, TIMP-1 e TGF- β no parênquima pulmonar. Estes mediadores atuam na produção de colágeno e fibras elásticas, contribuindo assim para o remodelamento da matriz extracelular.

Estudos recentes têm indicado que o fator de transcrição NF κ B é considerado um modulador crítico da inflamação na patogênese das doenças pulmonares (Gosens et al., 2004). Além da atividade do NF κ B, da liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, o epitélio também secreta fatores que influenciam diretamente as células dendríticas – principais células apresentadoras de antígeno no sistema imune (Hashimoto et al., 2002).

Observamos que a expressão celular de NF- κ B foi reduzida nos animais tratados com o inibidor da Rho quinase comparativamente ao notado em animais não tratados. Similarmente, Meyer-Schwezingen et al. (2009), quando avaliaram o papel da injúria inflamatória renal de camundongos, tratados com o inibidor da Rho quinase, obtiveram uma

atenuação da sinalização de NF- κ B, resultando na proteção contra a lesão. Estes dados sugerem que a sinalização do NF- κ B é também presente na via da Rho quinase.

O presente estudo tem algumas limitações. Foi utilizado o inibidor da Rho quinase (Y-27632) em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica de vias aéreas e parênquima pulmonar distal, e devido a isto, não podemos extrapolar diretamente nossos achados aos esperados em seres humanos. No entanto, nossos resultados apoiam a importância da Rho quinase na responsividade do parênquima pulmonar, nas respostas inflamatórias, no remodelamento da matriz extracelular e na via do estresse oxidativo. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações.

6 CONCLUSÕES

Neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica pode-se observar que:

1. A inibição Rho quinase diminuiu a resistência e elastância tecidual do parênquima pulmonar nos animais sensibilizados;
2. O tratamento com o inibidor da Rho quinase modulou o remodelamento da matriz extracelular do parênquima pulmonar, diminuindo a deposição de fibras colágenas e elásticas. Esta ação ocorreu provavelmente por uma diminuição da expressão das MMP-9, TIMP-1 e TGF- β ;
3. A inibição da Rho quinase atenuou a inflamação eosinofílica no parênquima pulmonar, assim como também reduziu a expressão de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ nas células inflamatórias do parênquima pulmonar;
4. Houve diminuição do estresse oxidativo em decorrência da atenuação da expressão de iNOS e 8-iso-PGF2 α ;
5. A inibição da Rho quinase atenuou a expressão celular de NF- κ B nos animais tratados, podendo representar um dos mecanismos de controle da inflamação, remodelamento e estresse oxidativo;
6. Houve uma forte correlação da Rt e da Et em relação a expressão de citocinas inflamatórias, marcadores de remodelamento e estresse oxidativo.

Adachi T, Vita R, Sannohe S, Stafford S, Alam R, Kayaba H. The functional role of Rho and Rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils. *J Immunol* 2001; 167:4609–15.

Aihara M, Dobashi K, Iizuka K, Nakazawa T, Mori M. Comparison of effects of Y-27632 and Isoprotenerol on release of cytokines from human peripheral T cells. *International Immunopharmacology* 2003; 3: 1619-1625.

Aihara M, Dobashi K, Iizuka K, Nakazawa T, Mori M. Effect of Y-27632 on release of cytokines from peripheral T cells in asthmatic patients and normal subjects. *International Immunopharmacology* 2004; 4:557-561.

Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 278(1):L193-201.

Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, 128(3):451-62.

Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PR, Tibério IF: Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue responses induced by chronic pulmonary inflammation mechanics, eosinophilic and extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 294:L1197-L1205.

Bachofen H. Lung tissue resistance in normal and asthmatic subjects. *Helv Med Acta* 1966;33(2): 108-21

Bardig, Niggli V. Loetscher P. Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett* 2003; 542: 79–83.

Barnes PJ. Drugs for asthma. *Br J Pharmacol* 2006;147: S297–S303.

Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008, 118(11):3546-56.

Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousque J, Drazen JM, FitzGerald M et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31:143-178.

Bell SG. The history of nitric oxide: from rascally radical to miracle molecule. *Neonatal Netw* 2004; 23(4):47-51.

Biagioli MC, Kaul P, Singh I, Turner RB. The role of oxidative stress in rhinovirus induced elaboration of IL-8 by respiratory epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(3-4):454-62.

Bile DE, Green FITY. Animal models of asthma. *Inhalation Toxicology* 2000; 12:829-862.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WB, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1720-1745.

Brannan JD. Bronchial Hyperresponsiveness in the assessment of asthma control. Airway Hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010; 138:11S-17S.

Breitenlechner C, Gaßel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, Bossemeyer D. Protein Kinase A in Complex with Rho-Kinase Inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: *Structural Basis of Selectivity. Structure*, 2003; 11, 1595–1607.

Buc M, Dzurilla M, Vrlík M, Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp* 2009; 57:331-344.

Busse W. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation. Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010; 1238 (Suppl):4S-10S.

Canning BJ, Chou Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pul Pharmacol Ther* 2008; 21:702-720.

Carroll N, Cooke C, James A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J* 1997;10(2): 292-300.

Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science* 1995; 268:221-225.

Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, et al. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003; 49:875–884.

Chapman JT, Choi AMK. Exhaled monoxides as a pulmonary function test: use of exhaled nitric oxide and carbon monoxide. *Clin Chest Med* 2001; 22:817-836.

Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis . Signal-induced site-specific phosphorylation targets kappa B-

alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1999; 9:1586–1597.

Chiba Y, Matsusue K, Misawa M. RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Journal of Pharmacological Sciences* 2010; 114(3):239-247.

Chiba Y, Misawa M. The role of RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *J Smooth Muscle Res* 2004; 40: 155-167.

Chiba Y, Sakai H, Suenaga H, Kamata K, Misawa M. Enhanced Ca^{2+} sensitization of the bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway hyperresponsive rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999;106:77–85.

Chiba Y, Takeyama H, Sakai H, Misawa M. Effects of Y-27632 on acetylcholine-induced contraction of intact and permeabilized intrapulmonary bronchial smooth muscles in rats. *European Journal of Pharmacology* 2001; 427:77-82.

Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:551-559.

Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L715-L731.

Darenfed H, Dayanandan B, Zhang T, Hsieh SHK, Fournier AE, Mandato CA. Molecular Characterization of the effects of Y-27632. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 2007; 64:97-109.

Dolhnikoff M, Morin J, and Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1607–1612,.

Ediger T, Schulte NA, Murphy TJ, Toews ML. Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 2003; 21:759-769.

Fahy JV. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: S46-S51.

Fernandes L, D'Aprile A, Self G, McGuire M, Sew T, Henry P, Goldie R. A Rho-kinase inhibitor, Y-27632, reduces cholinergic contraction but not neurotransmitter release. *European Journal of Pharmacology* 2006; 550:155-161.

Fernandes LB, Henry PJ, Goldie RG. Rho kinase as a therapeutic target in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 2007; 1:25-33.

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

Fukata Y, Kaibuchi K, Amano M, Kaibuchi K. Rho-kinase pathway inhibitor, Y-27632 in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganisation of non-muscle cells. *Trends Pharmacol* 2001; 22:32-39.

Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 2007; 100:607-621.

Gimeno JC. Modelos experimentales de asma. Aportaciones y limitaciones. *Arch Bronconeumol* 2003; 39:54-56.

Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) [<http://www.ginasthma.org>.]

Hacken NH, Oosterhoff Y, Kauffman HF, Guevara L, Satoh T, Tollerud DJ et al. Elevated serum interferon-gamma in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation. *Eur Respir J* 1998; 11:312-316.

Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10:236-245.

Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Mentzer SJ, Sugarbaker DJ, Doerschuk CM, Drazen JM. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(2): 565-72.

Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(1): 44-51.

Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 2009; 71:489-507.

Han S, Sidell N, Roman J. Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase. *Cancer Lett*. 2005 Feb 28;219(1):71-81.

Hargreave FE, Nair P. The definition and diagnosis of asthma. *Clinical Experimental Allergy* 2009; 39:1652-1658.

Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ;158(5 Pt 1):1585-92.

Hashimoto K, Peebles Jr RS, Sheller JR, Jarzecka K, Furlong J, Mitchell DB et al. Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitization and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *Thorax* 2002b, 57:524-527.

Hasslett C, Savill JS, Whyte MK, Stem M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345:327-333.

Hendeles L, Asmus M, Chresrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatric Respiratory Reviews* 2004; 5(Suppl): S107-S112.

Hendeles L, Asmus M, Chesrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma.. *Paediatr Respir Rev.* 2004; Suppl: S107-12.

Henry PJ, Mann TS, Goldie RG. A Rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; 18:67–74.

Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 1991; 267:8719–72.

Hirooka Y, Shimokawa H. Therapeutical potential of Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* 2005; 5:31-39.

Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3 Pt 2):S113-7.

Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergy International* 2008; 57:1-10.

Honing H, van den Berg TK, van der Pol SM, Dijkstra CD, van der Kammen RA, Collard JG, de Vries HE. RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 523–52.

Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshii A, Harada T, Dobashi K et al. Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *European Journal of Pharmacology* 2000; 406:273-279.

Jacoby DB, Fryer AD. Anticholinergic therapy for airways diseases. *Life Sci* 2001; 68:2565-2572.

James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodeling in airway diseases. *Eur Respir J* 2007; 30:134-155.

Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Catalli A, Cox G, Keshavjee S, Crankshaw DJ. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanos in human and canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:506-511.

Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:459–86.

Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25:593-620.

Kawano Y, Noma T. Modulation of mite antigen-induced immune responses by lecithin-bound iodine in peripheral blood lymphocytes from patients with bronchial asthma. *Eur Respir J* 1998; 11:312-6.

Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* 2005; 11: 148–152.

Kharitonov SA, Springall DR, Robbins RA. Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest* 1995; 107: 156S-157S.

Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuchi K, Somlyo AV, Somlyo AP. Receptor-coupled permeabilized smooth muscle. *J Biol Chem* 1988; 264: 5339-42.

Kobayashi M, Azuma E, Ido M, Hirayama M, Jiang Q, Iwamoto S et al. A pivotal role of Rho GTPase in the regulation of morphology and function of dendritic cells. *J Immunol* 2001; 167:3583–3591.

Kobayashi K, Nishimura Y, Yamashita T, Nishiuma T, Satouchi M, and Yokoyama M, The effect of overexpression of endothelial nitric oxide synthase on eosinophilic lung inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology*. 2006; 6(7):1040–1052.

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

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

Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T et al. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272:12257–60.

Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006;100(5):1610-6

Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001, 7(1):16-26.

Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes formation, analysis and use as indices of lipide peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274:24441-24444.

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

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

Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IFLC: Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 2004, 34:145–152.

Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expressional and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2010: S95-S102.

Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today*. 1992, 13(5):169-72.

López-Aguilar J, Romero PV. Effect of elastase pretreatment on rat lung strip induced constriction. *Respir Physiol* 1998; 113: 239–246.

Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59:469-478.

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M: Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 170: 857–862.

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

Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* 2008; 283:15533-15537.

Ministério da Saúde [internet]. Secretaria Executivas. DATASUS [acesso em setembro de 2011]. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade. Disponível em: www.datasus.gov.br

Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiovascular remodeling induced by passive smoking. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009, 8(5):334-9.

Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101(3):386-90.

Miotto D, Christodouloupoulos P, Olivenstein R, Taha R, Cameron L, Tsicopoulos A, Tonnel AB, Fahy O, Lafitte JJ, Luster AD, Wallaert B, Mapp CE, Hamid Q. Expression of IFN-gamma-inducible protein; monocyte chemotactic proteins 1, 3, and 4; and eotaxin in TH1- and TH2-mediated lung diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Apr;107(4):664-70.

Mong PY, Wang Q. Activation of Rho kinase isoforms in lung endothelial cells during inflammation. *The Journal of Immunology* 2009; 182:2385-2394.

Montuschi P, Corradi M, Ciabatonni G, Nightngale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:216-220.

Morrow JD. The isoprostanes – unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des* 2006; 12:895-902.

Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life Sci* 1970; 9:923-930.

Nabe T, Shinoda N, Yamada M, Sekioka T, Saeki Y, Yamamura H et al. Repeated antigen inhalation-induced reproducible early and late asthma in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75: 65-75.

Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takuwa Y. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C57–C65.

Nakashima AS, Prado CM, Lancas T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF: Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in Guinea pigs. *J Appl Physiol* 2008, 104:1778-1785.

Neffen H, Fritscher C, Schacht FC, Levy G, Chiarella P, Soriano JB, Mechali D. Asthma control in Latin America: the Asthma Insights and Reality in Latin America (AIRLA) survey. *Rev Panam Salud Publica* 2005, 17(3):191-7.

Norman V, Keith CH. Nitrogen oxides in tobacco smokes. *Nature* 1965, 205 (4974): 915-916.

Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:434-439.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC: Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol* 2005b, 288:L741–L748.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IFLC: 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* 2005a, 289: L677–L683.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic

airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35:457-465.

Prado CM, Yano L, Rocha G, Starling CM, Capelozzi VL, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF: Effects of nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* 2011, 37:259-268.

Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268:L699-722.

Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, Perini A, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério ID. 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;.[Epub ahead of print]

Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet L-F, Boushey HA, Busse WW et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180:59-99.

Reis FG, Marques RH, Starling CM, Almeida-Reis R, Vieira RP, Cabido CT, Silva LF, Lanças T, Dolhnikoff M, Martins MA, Leick-Maldonado EA, Prado CM, Tibério IF. Stress amplifies lung tissue mechanics, inflammation and oxidative stress induced by chronic inflammation. *Exp Lung Res* 2012; 38(7):344-54.

Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54:577-589.

Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84:731-765.

Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58:175-182.

Rocco PR, Negri EM, Kurtz PM, Vasconcellos FP, Silva GH, Capelozzi VL, Romero PV, Zin WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1067–1071.

Rodway GW, Chou J, Hoffman LA, Sethi JM. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. *Chron Respir Dis* 2009; 6:19-29.

Romero PV, Zin WA, Lopez-Aguilar J. Frequency characteristics of lung tissue strip during passive stretch and induced pneumoconstriction. *J Appl Physiol* 2001; 91: 882–890.

Ruiz-Schütz VC, Drewiacki T, Nakashima AS, Arantes-Costa FM, Prado CM, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF: Oral tolerance attenuates airway inflammation and remodeling in a model of chronic pulmonary allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol* 2009, 165: 13–21.

Saito H, Minamiya Y, Saito S, Ogawa J. Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 829–836.

Salerno FG, Dallaire M, Ludwig MS. Does the anatomic makeup of parenchymal lung strips affect oscillatory mechanics during induced constriction?. *J Appl Physiol*. 1995;79(1): 66-72.

Salerno FG, Fust A, Ludwig MS. Stretch-induced changes in constricted lung parenchymal strips: role of extracellular matrix. *Eur Respir J* 2004;23(2): 193-8.

Salerno FG, Pare P, Ludwig MS. A comparative study of elastic properties of rat and guinea pig parenchymal strips. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3 Pt 1): 846-52.

Sanjar S, Aoki S, Kristersson A, Smith D, Morley J. Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br J Pharmacol* 1990; 99:679-686.

Schaafsma D, Bos ST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *Respiratory Research* 2006; 7:121.

Schaafsma D, Bos ST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. The inhaled Rho kinase inhibitor Y-27632 protects against allergen-induced acute bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295:L214-L219.

Schaafsma D, Gosens R, Bos ST, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans A. Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction. *British Journal of Pharmacology* 2004; 143:477-484.

Schaafsma D, Gosens R, Zaagsma J, Halayko AJ, Meurs H. Rho kinase inhibitors: a novel therapeutical intervention in asthma?. *European Journal of Pharmacology* 2008b; 585:398-406.

Sheppard MN, Harrison NK. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 1. Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax* 1992; 47: 1064-1074.

Shin YS, Takeda K, Gelfand GW. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res* 2009; 1:10-18.

Shiraki A, Kume H, Makino Y, Ito S, Shimokata K, Honjo H et al. Role of Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} sensitization in 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -induced contraction in airway smooth muscle. *Clinical and Experimental Allergy* 2008; 39:236-245.

Smith N, Broadley KJ. Optimisation of the sensitization conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *International Immunopharmacology* 2007; 7:183-190.

Solé D, Yamada E, Vanna AT, Werneck G, Freitas SL, Sologuren MJ et al. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2001;11:123-8.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev* 2003, 83:1325-1358.

Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF: Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol* 2009, 165:185-194.

Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergology International* 2007; 56:341-348.

Sylvester JT. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L624-L630.

Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res Rev Med* 2002; 53:477-498.

Taki F, Kume H, Kobayashi T, Ohta H, Aratake H, Shimokata K. Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. *Clinical and Experimental Allergy* 2007; 37:599-607.

Tang LF, Du LZ, Chen ZM, Zou CC. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in bronchoalveolar lavage cells of asthmatic children. *Fetal Pediatr Pathol* 2006; 25:1-7.

Tang LF, Du LZ, Zou CC, Gu WZ. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in guinea pig asthma model following ovalbumin challenge. *Fetal Pediatr Pathol* 2005; 24:81-87.

Tattersfield, A. E., Knox, A. J., Britton, J. R., & Hall, I. P. (2002). Asthma. *Lancet* 2002; 360:1313–1322.

Terán LM, Ledesma-Soto Y, Krengel S, Lezcano-Meza D. The role of eotaxins in bronchial asthma and nasal polyposis. *Gac Med Mex* 2006; 142(2):139-44.

Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, Warth TN, Lapa e Silva JR, Saldiva PH, Martins MA: Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155: 1739-1747.

Tripathi P and Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response *Current science*. 2006;90(4): 519-532

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.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997; 389:990–4.

Upham JW; Stick SM. Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Current Drug Targets* 2006; 7: 541–545.

Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clinical and Experimental Allergy* 1999; 29 (suppl 1):9-13.

Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, et al. Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol* 1996; 106:114-119.

Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J allergy Clin Immunol* 2000; 105:1041-1053.

Vignola AM, Mirabella F, Constanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003; 123:417S-422S.

Weibel ER. The challenge of measuring lung structure. In: Standards for the Quantitative Assessment of Lung Structure. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2010; 48(9):637-43.

Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, Liu MC. Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(2): 447-52.

Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta Sugata N, Takai Nishizaki KT. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 105–112.

Watt AP, Schock BC, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Current Drug Targets Inflammation Allergy* 2005; 4: 415–423.

Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med* 2002; 80:629-638.

Witzenrath M, HRVAens B, Schmeck B, Kube SM, Hippenstiel S, Rosseau S et al. Rho-kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008; 60:9-15.

Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, cooper DM, Garg ML. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids*. 2000; 35:967-974.

Xiao W. Advances in NF- κ B Signaling Transduction and Transcription. *Cellular & Molecular Immunology*. 2004;1(6):425-436.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa ESJR, et al. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(8): 829-37.

Yanai M, Sekizawa K, Ohnishi T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol* 1992;72(3): 1016-23.

Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T et al. Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca^{2+} sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:1190–2000.

Zoritch B. Nitric oxide and asthma. *Archives of Disease in Childhood* 1995; 72:259-262.

Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2007; 37:973-988.

MEDICINA

USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo