Patricia Angeli da Silva Pigati

Tratamento com inibidor da Rho quinase associado ou não ao uso de corticosteróides em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica: modulação da inflamação, do estresse oxidativo, do remodelamento da matriz extracelular e da reatividade de vias aéreas e de 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, 2013

PATRICIA ANGELI DA SILVA PIGATI

**Tratamento com inibidor da Rho quinase
associado ou não ao uso de corticosteróides
em cobaias com inflamação pulmonar alérgica
crônica: modulação da inflamação, do estresse
oxidativo, do remodelamento da matriz
extracelular e da reatividade de vias aéreas e
de parênquima pulmonar**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

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

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pigati, Patricia Angeli da Silva

Tratamento com inibidor da Rho quinase associado ou não ao uso de corticosteróides em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica : modulação da inflamação, do estresse oxidativo, do remodelamento da matriz extracelular e da reatividade de vias aéreas e de parênquima pulmonar / Patricia Angeli da Silva Pigati. -- São Paulo, 2013.

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.Asma 2.Corticosteróides/farmacologia 3.Quinases associadas a rho 4.Inibidores de proteína quinases 4.Cobaias 5.Dexametasona/antagonistas & inibidores 6.Modelos animais 7.Matriz extracelular 8.Remodelamento das vias aéreas

USP/FM/DBD-093/13

*“O que vale na vida não é
o ponto de partida e sim a
caminhada. Caminhando e
semeando no fim terás o que
colher”.*

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese de Doutorado a três pessoas muito especiais que estiveram sempre ao meu lado durante a realização deste trabalho:

Ao meu companheiro, meu amigo, meu marido Jose Roberto de Azevedo Pigati, pelo apoio em cada etapa da realização da minha pesquisa. Você contribuiu do início ao fim deste trabalho e na busca desta importante titulação, me apoiando e incentivando principalmente nos momentos mais difíceis. A você, MEU AMOR, OBRIGADA! Sei o quanto orgulhoso da sua esposa você deve estar.

A você Renato Fraga Righetti, meu amigo e meu irmão adotivo, várias vezes MUITO OBRIGADA! Em cada página desta tese tem a sua participação, por isso minha gratidão a você é ETERNA e minha amizade fiel e IMORTAL. Sem sua ajuda teria sido impossível, por isso a dedicatória merecida.

A minha orientadora Dra Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério, por mais uma vez ter acreditado na minha capacidade proporcionando-me a oportunidade de adquirir vasto crescimento intelectual e profissional. Muito obrigada por tantos domingos de sol que me dedicou aqui na USP, com tanto carinho, conhecimento e dedicação. Eternamente grata serei a você minha grande MESTRA.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Darci, chefe dos laboratórios da Universidade Metodista de Piracicaba (UNIMEP) por todo apoio prestado durante a realização dos experimentos. Sem sua ajuda seria impossível a conclusão deste trabalho. Obrigada por sempre encontrar uma solução e nunca criar dificuldade para que tudo desse certo!

À Anelize Sartori, Julie Paixão, Giovana Sarmento e Osvaldo Marteniuk pela ajuda indispensável durante a realização dos experimentos. Muito obrigada!

À Adriana Palmeira Dias Rodrigues por estar sempre disponível e disposta durante os períodos de sua colaboração neste trabalho.

Ao querido Marlon Longo pelos dois presentes que me deu ao longo da realização deste trabalho: o primeiro foi sua amizade e o segundo a linda capa que embeleza esta tese.

Aos amigos fisioterapeutas do Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba: Caroline Berto Ometto, Eder Martins Christofolli e Davi Jose Dias, meus agradecimentos pelo apoio e incentivo que me deram durante a realização deste trabalho.

Às pesquisadoras Adenir Pernini e Fernanda Lopes pela rica contribuição dedicada a esta pesquisa durante a participação na minha banca de qualificação.

Aos meus queridos pais José e Lúcia, desde o início contei com o apoio e carinho de vocês para poder ingressar nos estudos acadêmicos. Obrigada de coração!

À Carla Máximo Prado, sempre serei grata por todo o apoio pessoal e intelectual oferecido por você desde o início dos meus estudos na Universidade de São Paulo.

À Edna Leick, Barbara Oliveira Xavier, Fernanda Roncon, Clarice Olivo pela colaboração nos momentos em que precisei de ajuda de cada uma de vocês.

À mais que querida Rosana Paz, por toda a disposição em ajudar e solucionar! É um privilégio mais uma vez poder ter contado com você.

À Elaine Manuel, meus sinceros agradecimentos por todas as vezes que precisei de seu auxílio.

Aos pesquisadores do Laboratório de Fisiologia Pulmonar da Universidade Federal do Rio de Janeiro: Profa Patrícia Rocco, Débora Xisto e Mariana pela parceria na realização de parte dos experimentos.

Às meninas da minha vida: Letícia, Giovanna, Gabriella, Bruna e Lívia, obrigada por vocês existirem e serem tão especiais para mim.

Às minhas queridas irmãs Daniela e Viviane Angeli por me incentivarem a nunca desistir nos momentos de dificuldades.

Aos meus queridos enteados Felipe e Bianca Pigati pela torcida durante a realização do meu Doutorado.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Asma Brônquica	2
1.1.1.	Aspectos Epidemiológicos	2
1.1.2.	Definição	7
1.1.3.	Fatores de Risco	7
1.1.4.	Fisiopatologia	11
1.1.5.	Remodelamento da Matriz Extracelular	17
1.1.6.	Óxido Nítrico, Estresse Oxidativo e Asma.....	23
1.1.7.	Importância do Parênquima Pulmonar na Fisiopatogenia da Asma	30
1.2.	Rho/ Rho Quinase.....	34
1.2.1.	Aspectos Gerais	34
1.2.2.	Principais Inibidores da Rho Quinase	36
1.2.3.	Rho Quinase, Músculo Liso e Asma	38
1.3.	Glucocorticosteróides e Asma.....	46
1.4.	Relevâncias do Modelo Experimental Utilizado	50
1.5.	Justificativa para o Estudo	53
2.	OBJETIVOS	55
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1.	Animais	58
3.2.	Grupos Experimentais.....	59
3.3.	Protocolo de Sensibilização	60

3.4.	Tratamento com Inibidor da Rho Quinase (Y-27632).....	62
3.5.	Tratamento com Corticosteróide	62
3.6.	Mensuração do Óxido Nítrico Exalado (NO _{EX})	63
3.7.	Avaliação da Mecânica Pulmonar	64
3.7.1.	Mecânica do Sistema Respiratório.....	64
3.7.2.	Mecânica Oscilatória do Tecido Pulmonar	65
3.8.	Estudos Morfométricos.....	69
3.8.1.	Quantificação de Fibras Colágenas e Elásticas	70
3.8.2.	Quantificação de Eosinófilos	71
3.8.3.	Avaliação Imunohistoquímica.....	72
3.9.	Anafilaxia Cutânea Passiva.....	74
3.10.	Análise Estatística	75
4.	RESULTADOS	76
4.1.	Tempo de Inalação.....	77
4.2.	Óxido Nítrico Exalado.....	79
4.3.	Avaliação da Mecânica do Sistema Respiratório	80
4.4.	Avaliação da Mecânica Oscilatória do Parênquima Pulmonar	82
4.5.	Análises Morfométricas	84
4.5.1.	Avaliação de Proporção de Estruturas do Parênquima Pulmonar ..	84
4.5.2.	Avaliação do Conteúdo de Fibras Elásticas e Colágenas nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar	84
4.5.3.	Avaliação da Proporção de Volume de Actina nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar	89
4.5.4.	Avaliação da Densidade de Eosinófilos nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar	91
4.5.5.	Avaliação das Citocinas Inflamatórias IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e INF- Gama nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar.....	93

4.5.6. Avaliação do Estresse Oxidativo nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar	104
4.5.7. Avaliação da Expressão de NF- κ B nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar	108
4.5.8. Avaliação da Expressão Celular de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nas Vias Aéreas e no Parênquima Pulmonar	110
4.6. Análise de Correlação	116
4.7. Efeitos na Anafilaxia Cutânea Passiva.....	121
4.8. Avaliação Qualitativa.....	122
5. DISCUSSÕES.....	138
6. CONCLUSÕES	159
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Transporte aminoácido catiônico
CLM	Cadeia leve da miosina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Ers	Elastância do sistema respiratório
et al.	e outros
Et	Elastância tecidual
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GAPS	Proteínas ativadoras de GTPases
GC	Glucocorticosteróides
GCI	Glucocorticosteróides inalatórios
GDI	Inibidores de dissociação de GTPase
GDP	Guanina difosfato
GEFs	Fatores de troca guanina nucleotídeo
GINA	Global Initiative National of Asthma
GRUPO ORC	Animais submetidos à inalação com solução de ovoalbumina, inalação de Y-27632 e tratamento com corticosteróide.
GRUPO OVA	Animais submetidos à inalação com solução de ovoalbumina.
GRUPO OVA-C	Animais submetidos à inalação com solução de ovoalbumina e tratamento com corticosteróide.
GRUPO OVA-RHO	Animais submetidos à inalação com solução de ovoalbumina e inalação de Y-27632.
GRs	Receptores de glucocorticóides
GRUPO SAL	Animais submetidos à inalação com soro fisiológico.
GRUPO SAL-C	Animais submetidos à inalação com soro fisiológico e tratamento com corticosteróide.
GRUPO SAL-RHO	Animais submetidos à inalação com soro fisiológico e inalação de Y-27632.
GRUPO SRC	Animais submetidos à inalação com soro fisiológico, inalação de Y-27632 e tratamento com corticosteróide.
GTP	Guanina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IGF	Fator de crescimento tipo-insulina
IgG	Imunoglobulina G
IL-	Interleucina
Inos	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intra-peritoneal
JNK	Quinase C-Jun-terminal
L-Name	L-NG-nitroarginina metil ester
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPS	Lipopolissacáride
MAP quinase	Mitógeno proteínas-quinases ativadas
MMP	Metaloproteinase
MQ	Mioquinase
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NAPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
Noex	Óxido nítrico exalado
NOS	Óxido nítrico sintases
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OVA	Ovoalbumina
PBS	Solução tampão salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEEP	Pressao positiva expiratória final
Ptr	Pressão traqueal
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada pelos linfócitos T
ROCK	Proteínas quinase associada à Rho
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rrs	Resistência do sistema respiratório
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	T <i>helper</i>
TI	Tempo de inalação
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz
TNF	Fator de necrose tumoral
V	Volume
V'	Fluxo

RESUMO

Pigati PAS. *Tratamento com inibidor da Rho quinase associado ou não ao uso de corticosteróides em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica: modulação da inflamação, do estresse oxidativo, do remodelamento da matriz extracelular e da reatividade de vias aéreas e de parênquima pulmonar* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Embora os corticosteróides sejam considerados tratamento padrão-ouro na asma, pacientes com asma grave não são totalmente controlados com este tratamento. Estudos prévios com inibidores da Rho quinase sugeriram uma influência benéfica destas drogas na asma, atuando como uma possível alternativa anti-inflamatória. No entanto, não há estudos anteriores avaliando os efeitos destes inibidores, associados ou não com corticosteróides, na modulação da mecânica do sistema respiratório e oscilatória do tecido pulmonar distal, assim como nas alterações histopatológicas, em modelo animal de inflamação pulmonar crônica. **OBJETIVOS:** Avaliar se o tratamento com o inibidor específico da Rho (Y-27632), associado ou não com a dexametasona modula a resposta de mecânica pulmonar, inflamatória, de remodelamento da matriz extracelular e ativação do estresse oxidativo em cobaias com inflamação alérgica crônica. **MÉTODOS:** As cobaias receberam sete inalações de ovoalbumina (1-5mg/ml; grupo OVA) durante 4 semanas. A partir da quinta inalação, os animais do grupo da Rho quinase receberam inalação de Y-27632 (1mM) (grupo OVA-RHO) e ou dexametasona (2 mg.kg⁻¹) associada ou não a Y-27632 (grupos OVA-C ou grupos ORC), 10 minutos antes de cada inalação com OVA. Setenta e duas horas depois da sétima inalação, os animais foram anestesiados, exsanguinados, o óxido nítrico exalado foi coletado e a mecânica do sistema respiratório (Ers e Rrs) e oscilatória do tecido pulmonar distal (Et e Rt) foram realizadas em condições basais e após desafio com OVA (0,1%). Após, as fatias de pulmão foram removidas e submetidas à avaliação histopatológica. **RESULTADOS:** Houve um aumento no óxido nítrico exalado, nas respostas máximas de Ers, Rrs, Rt e Et após desafio antigênico, nos eosinófilos, nas células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , iNOS, MMP-9, TIMP-1, TGF- β , NF κ B e no conteúdo do 8-iso-PGF2 α , no conteúdo de fibras elásticas, colágenas e de actina em vias aéreas e no parênquima pulmonar distal do grupo OVA comparado ao controle (P<0,05). Nos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC houve uma diminuição em todos os parâmetros comparados ao grupo OVA (P<0,05). A associação do Y-27632 com o tratamento com corticosteróide (grupo ORC) potencializou a atenuação do conteúdo de colágeno e IFN- γ na parede das vias aéreas e IL-2, IFN- γ , 8-iso-PGF2 α e NF- κ B no parênquima distal comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C (P<0,05). No grupo ORC houve uma redução nas células positivas para TIMP-1 e eosinófilos no septo alveolar comparado ao grupo OVA-C (P<0,05). **CONCLUSÕES:** A inibição da Rho quinase ou o tratamento com corticosteróides contribuíram para o controle da resposta de mecânica pulmonar, da resposta eosinofílica e linfocitária Th1 e Th2, do remodelamento da matriz extracelular e da ativação do estresse oxidativo nas vias aéreas e parênquima distal neste modelo animal. A associação do inibidor da Rho quinase com o corticosteróide potencializou o controle de parte da resposta de remodelamento e de inflamação nas vias aéreas e parênquima. A inibição da Rho quinase associada ou não a corticosteróides pode ser considerada uma ferramenta farmacológica futura para o tratamento de doenças pulmonares crônicas.

Descritores: Asma; Corticosteróides/farmacologia; Quinases associadas a rho; Inibidores de proteína quinases; Cobaias; Dexametasona/antagonistas & inibidores; Modelos animais; Estresse oxidativo; Matriz extracelular; Remodelamento das vias aéreas.

SUMMARY

Pigati PAS. *Treatment with Rho-kinase inhibitor associated or not with corticosteroids in guinea pigs with chronic allergic pulmonary inflammation: modulation of inflammation, oxidative stress, extracellular matrix remodeling, and responses of the airways and lung parenchyma* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUCTION: Although corticosteroids are considered gold standard of asthma treatment, patients with serious asthma are not totally controlled with this treatment. Previous studies with Rho-kinase inhibitors suggested a beneficial influence of these drugs on asthma, being a possible anti-inflammatory alternative. However, there are no previous studies evaluating in an animal model of chronic pulmonary inflammation the effects of such inhibitors, combined or not with corticosteroids, on the mechanics modulation of the respiratory system and oscillation of distal pulmonary tissue, as well as on histopathological alterations. **OBJECTIVES:** To evaluate whether treatment with the specific Rho inhibitor (Y-27632), combined or not with dexamethasone, modulates the responses of pulmonary mechanics, inflammation, extracellular matrix remodeling, and oxidative stress activation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. **METHODS:** Guinea pigs received seven ovalbumin inhalations (1-5mg/ml; OVA group) during 4 weeks. After the fifth inhalation, the animals of the Rho-kinase group received inhalation of Y-27632 (1mM) (OVA-RHO group) and/or dexamethasone (2 mg.kg⁻¹), combined or not with Y-27632 (OVA-C groups or ORC groups), 10 minutes before each inhalation with OVA. Seventy-two hours following the seventh inhalation, the animals were anesthetized, exsanguinated, the exhaled nitric oxide was collected, and mechanics of the respiratory system (Ers and Rrs) and oscillation of the distal lung tissue (Et e Rt) were performed in basal conditions and after challenge with OVA (0.1%). Afterwards, lung slices were removed and submitted to histopathological evaluation. **RESULTS:** There was an increase of exhaled nitric oxide, maximum responses of Ers, Rrs, Et and Rt after antigen challenge, eosinophil counts, cells positive for IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , iNOS, MMP-9, TIMP-1, TGF- β , NF κ B, and in the content of 8-iso-PGF2 α , elastic fibers, collagen fibers and actin in the airways in distal lung parenchyma of the OVA group, compared to the control (P<0.05). In the OVA-RHO, OVA-C and ORC groups there was a decrease in all parameters, when compared to the OVA group (P<0.05). The treatment combining Y-27632 with corticosteroid (ORC group) maximized the attenuation of the content of collagen and IFN- γ in the airways walls, and of IL-2, IFN- γ , 8-iso-PGF2 α and NF- κ B in distal parenchyma, when compared to the OVA-RHO and OVA-C groups (P<0.05). In the ORC group, there was a reduction of cells positive for TIMP-1 and eosinophils in the alveolar septum, compared to the OVA-C group (P<0.05). **CONCLUSIONS:** Rho kinase or treatment with corticosteroids contributed to the control of the pulmonary mechanics response, Th1 and Th2 lymphocyte and eosinophil responses, extracellular matrix remodeling, and activation of the oxidative stress in the airways and distal parenchyma of this animal model. The combined treatment with Rho kinase and corticosteroid maximized the control of part of the remodeling response and inflammation of the airways and parenchyma. Rho-kinase inhibition combined or not with corticosteroids can be considered a future pharmacological tool for treatment of chronic pulmonary diseases.

Descriptors: Asthma; Adrenal cortex hormones/pharmacology; rho-associated kinases; Protein kinase inhibitors; Guinea Pigs; Oxidative stress; Models, animal; Dexamethasone/antagonists & inhibitors; Extracellular matrix; Airway remodeling.

1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASMA BRÔNQUICA

1.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Apesar dos avanços com relação ao tratamento e o melhor entendimento da fisiopatologia da asma são ainda significativas as consequências pessoais, econômicas e sociais ocasionadas por esta doença (GINA, 2011). Em muitos países é considerada como um problema de saúde pública independente de seu nível de desenvolvimento econômico, atingindo pessoas de todas as idades e etnias. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 300 milhões de pessoas são afetadas no mundo, resultando em aproximadamente 235.000 mortes por ano (WHO, 2007).

Resultados de dois grandes estudos multinacionais que utilizaram questionário com metodologia padronizada, o *European Community Respiratory Healthy Survey* (ECRHS) em adultos e o *Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) em crianças e adolescentes, mostraram grande disparidade na prevalência de asma ao redor do mundo entre países e também dentro de países, com maior tendência da doença em nações mais desenvolvidas e ocidentalizadas (ECRHS, 1996; ISAAC, 1998).

A terceira fase do questionário ISAAC foi conduzida entre os anos de 2000 e 2003 e incluiu o maior número de centros das principais regiões do mundo já anteriormente estudadas, sendo cerca de 1.200.000 crianças entrevistadas. A maior prevalência de asma foi encontrada em países de língua inglesa e na América Latina. Na África, na Índia e no Mediterrâneo Oriental a doença parece ser mais grave e menos frequentemente reconhecida (Lai et al., 2009). A Figura 1 mostra a distribuição geoespacial de sintomas de asma em indivíduos na faixa etária entre 13 a 14 anos de idade e sua associação com a renda percapita dos países que participaram do estudo ISAAC fase 3.

Estima-se que no ano de 2007 nos EUA, o custo anual com a asma foi de 18 bilhões de dólares sendo 10 bilhões de dólares gastos com os chamados custos diretos (hospitalizações) e 8 bilhões contabilizados com custos indiretos em consequência da invalidez ou morte (Bäiz e Annesi-Maesano; 2012).

O paciente asmático durante a exacerbação de suas crises ausenta-se do trabalho e da escola e tem dificuldades na realização de suas atividades diárias (Sullivan et al., 2011). Estima-se que cerca de 3 milhões de dias de trabalho por ano são perdidos nos EUA devido as crises de asma (Amorim e Daneluzzi, 2001; GINA 2011). Em casos mais graves, provoca a antecipação da aposentadoria e a morte prematura por insuficiência respiratória, sendo esta última uma das consequências mais temidas desta doença (Bousquet et al., 2005).

Figura 1. Distribuição geoespacial da prevalência de sintomas atuais de asma e renda dos países em grupos entre 13 e 14 anos de idade. Os quatro símbolos descrevem diferentes níveis de prevalência de sintomas de asma combinados com a categorização dos países de baixa e alta renda. (Adaptado de Mallol et al., 2012).

Considerando-se os dados catalogados pelo DATASUS (Base de Dados do Sistema Único de Saúde), em 2011 as crises asmáticas foram responsáveis por 772 óbitos no Brasil, sendo 26 ocorridas no Estado de São Paulo. Além disso, aproximadamente 173.000 casos de internações por asma foram registrados no Brasil entre Janeiro e Dezembro de 2011. Estes dados estão melhores detalhados na Tabela 1.

É interessante notar na Tabela 1 que, das internações registradas pelo SUS, em torno de 56% ocorreram em crianças até 14 anos de idade e aproximadamente 27% em indivíduos entre 15 a 59 anos, faixa etária considerada economicamente ativa.

Tabela 1. Número de internações hospitalares por asma segundo faixa etária no ano de 2011. FONTE: Ministério da Saúde – Sistema de Informações Hospitalares (SIH-SUS).

FAIXA ETÁRIA	INTERNAÇÕES
< 1 ano	15.924
1 a 4 anos	48.734
5 a 9 anos	24.854
10 a 14 anos	10.747
15 a 19 anos	6.173
20 a 29 anos	7.795
30 a 39 anos	10.607
40 a 49 anos	10.795
50 a 59 anos	10.455
60 a 69 anos	10.118
70 a 79 anos	10.576
80 anos e mais	7.107
TOTAL	173.885

Constata-se também no Brasil que os gastos com medicações e hospitalizações são altos, tanto para o governo como para o próprio paciente. No ano de 2011, foi registrado um gasto de R\$ 94.266.793,46 com internações e medicações para a doença (DATASUS, 2011).

Algumas ações do governo vêm sendo realizadas no Brasil na tentativa de assistir pacientes vítimas de asma. Após a gratuidade de medicamentos para diabetes e hipertensão, percebeu-se que a medicação mais vendida nas farmácias era para o tratamento da asma. Em junho de 2012, O Ministério da Saúde incluiu no programa “Saúde Não Tem Preço”, três medicamentos para asma (brometo de ipratrópio, dirpoprionato de beclometasona e sulfato de sabultamol) de forma totalmente gratuita. Espera-se que com esta ação haja redução no número de internações principalmente entre crianças de 0 a 6 anos, assim como também um impacto positivo sobre a mortalidade (Fonte: Ministério da Saúde).

Contudo, ainda é preocupante sua forma de apresentação mais grave, pois quando não controlada, tem repercussão na qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares, pois pode promover importante limitação física, emocional e intelectual podendo em alguns casos ser fatal (Santos et al., 2007).

1.1.2. DEFINIÇÃO

A definição mais recente da asma é datada de 2011, publicada pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA):

“A asma é uma desordem crônica inflamatória de vias aéreas onde diversas células e elementos celulares desempenham um papel. A inflamação crônica está associada à hiperresponsividade das vias aéreas que tem como consequência, episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e início da manhã. Esses episódios estão normalmente associados à obstrução variável ao fluxo que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento”.

1.1.3. FATORES DE RISCO

A asma é uma das mais sérias e intrigantes doenças alérgicas. Além de definição extensa, vários são os fatores externos e ambientais responsáveis pelo início das crises. Segundo o GINA (2011) o desencadeamento dos sintomas pode ser devido a contato com:

a) Alérgenos:

- Domésticos: Ácaros, animais (cães, gatos, ratos), barata, fungos e mofos;
- Externos: Pólen, fungos, mofo e hifas.

b) Agentes Ocupacionais:

- Tabaco: Fumantes ativos e/ou passivos
- Poluentes: Domésticos e ambientais
- Infecções (principalmente as virais)
- Fatores sócio-econômicos
- Número de familiares na casa
- Dietas
- Drogas

Acrescenta-se ainda o fator hereditariedade, onde múltiplos genes podem estar envolvidos e determinar a atopia, caracterizada pela produção de anticorpos alérgenos específicos imunoglobulina E (IgE), a hiper-responsividade, a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e de crescimento e a diferença do raio de resposta imune Th1-Th2 (Wiesch et al., 1999) .

Além dos genes responsáveis por definir a doença, há ainda genes incumbidos de determinar a responsividade do paciente asmático ao tratamento farmacológico.

Existem variados graus de resposta de pacientes a fármacos tais como β_2 agonista, glucocorticosteróides e modificadores de leucotrienos, dificultando muitas vezes o tratamento e o controle das crises (Tattersfield et al., 2004; Israel et al., 2004 ; Ito et al., 2006).

De acordo com Bijanzadeh et al. (2011) existem mais de 100 possíveis genes em cada cromossomo que foram identificados por ter associação com a asma, variando em diferentes partes do mundo.

A razão pela qual várias pessoas são expostas a substâncias semelhantes e nem todas desenvolvem a asma brônquica, pode estar relacionada à predisposição genética, principal fator responsável pelo desenvolvimento da resposta mediada pela IgE (NIH, 1997; Grasemann et al., 1999; Gao et al., 2000; GINA, 2011). Os anticorpos tipo IgE específicos podem ser detectados no soro ou por meio de testes cutâneos para uma série de alérgenos (Pearce et al., 1999; GINA, 2011).

Os cromossomos 5q, 11q, 12q e 13q contêm vários genes responsáveis pelo desenvolvimento de atopia e asma. Mutações genéticas no cromossomo 5q parecem ser importantes para o desenvolvimento de inflamação na asma e a atopia, incluindo genes para as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13 and GSF. É importante lembrar que IL-4 é uma das principais citocinas responsável pela diferenciação linfocitária Th2 e pelo estímulo à produção de IgE (Martinez e Helms, 1998).

Também vem sendo observado um aumento da prevalência de asma em indivíduos obesos (Green, 2012). A obesidade pode estar relacionada a vários fatores como, por exemplo, ao uso de glucocorticóides sistêmicos somado ao estilo de vida sedentário do paciente. No entanto, muitas vezes a obesidade precede o desenvolvimento das crises asmáticas (GINA, 2011). A perda de peso está associada à melhora da função pulmonar, dos sintomas,

da redução de medicações e da morbidade neste grupo de pacientes (Stenius-Aarniala et al., 2000).

Na infância, a prevalência de asma é maior no sexo masculino e praticamente dobra próximo dos 14 anos de idade em comparação ao sexo feminino. Em adultos a prevalência de asma é maior em mulheres do que em homens, porém as razões determinadas pelo sexo ainda são desconhecidas (GINA, 2011).

A prevalência de asma é bem menor em pessoas que residem no campo em relação aquelas que residem em grandes centros industrializados (Wright e Subramanian, 2007). Fatores que podem contribuir para que estas diferenças e, conseqüentemente, sua maior ou menor prevalência podem estar relacionados às condições de higiene, exposição a agentes infecciosos principalmente na infância, a diferentes hábitos alimentares, aos contatos com animais de estimação, ao número de familiares morando na mesma casa e ao fumo materno (Martinez e Helms, 1998). Esta linha de pensamento vem da evidência experimental que a exposição a micróbios ajuda a inclinar a resposta imunológica para longe do fenótipo alérgico e em direção à resposta imunológica adulta “normal”, não atópica. Isto levou ao desenvolvimento da “hipótese da higiene”, que sugere que diminuição dos níveis de exposição a estímulos microbianos nos países desenvolvidos, particularmente durante a indução das respostas Th1/Th2 primárias a alérgenos na infância, pode ser responsável pelo aumento da prevalência de asma (Hamid e Tulic, 2009).

Outros fatores como estresse, exercício físico, infecções virais, exposição à fumaça do cigarro, exposição a agentes ocupacionais e poluição são também determinantes para o início dos sintomas (Cabral et al., 1999; GINA, 2011).

1.1.4. FISIOPATOLOGIA

Variadas alterações fisiopatológicas ocorrem nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de pacientes asmáticos quando o indivíduo é exposto a fatores desencadeantes da doença (GINA, 2011).

Todo o processo para o desenvolvimento da asma tem início com a sensibilização. Células como os macrófagos alveolares, as epiteliais e principalmente as células dendríticas, consideradas células apresentadoras de antígeno, vão interagir com os linfócitos auxiliares Th0 e, por meio dos linfócitos B, desencadear a produção de IgE (Nakajima et al., 1997). Apesar do sistema respiratório apresentar uma série de mecanismos de defesa, que limitam o acesso dos antígenos ao sistema imunológico, indivíduos atópicos desenvolvem anticorpos do tipo IgE específicos aos alérgenos a qual foram expostos (Platts-Mills e Wheatley, 1996; Holgate, 1997).

Quando estes anticorpos são liberados na circulação eles se ligam aos receptores de alta afinidade presentes na superfície de mastócitos e, uma vez exposto novamente ao antígeno, uma resposta humoral secundária será iniciada. Ocorrerá então a desgranulação dos mastócitos, com a liberação subsequente de histamina, prostaglandinas e cisteinil-leucotrienos, levando ao aumento dos tônus da musculatura lisa brônquica, edema de mucosa

com conseqüente obstrução ao fluxo aéreo (Pauwels, 1989). Esta fase é chamada de imediata e pode durar de 2 a 4 horas com quadro clínico caracterizado por tosse, chiado e falta de ar.

Além dos danos citados acima, os grânulos liberados dos mastócitos podem ainda causar várias alterações como agressão epitelial, anormalidades no controle neural autônomo do tônus da via aérea, hipersecreção de muco e aumento da responsividade do músculo liso das vias aéreas (Bousquet et al., 2000; GINA, 2011).

As células apresentadoras de antígenos têm como função induzir a tolerância a estes antígenos, processo conhecido como tolerização. Caso isso não ocorra, as células T CD4⁺ desviam para um perfil Th2 (Van Parijs e Abbas, 1998; GINA, 2011). Inicia-se então o recrutamento de linfócitos T, eosinófilos e neutrófilos para as vias aéreas resultando na liberação de outros mediadores inflamatórios (Bousquet et al., 1990; Santing et al., 1994; Schuiling et al., 1998).

Sendo assim, uma vez ativados, os linfócitos Th2, liberam interleucinas (ou linfocinas), tais como IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 estimula os linfócitos a produzirem IgE, que então se liga à superfície dos mastócitos (Buc et al., 2009). A figura 2 representa um esquema ilustrativo do mecanismo fisiopatológico da asma.

Cerca de 30 tipos de diferentes citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma já foram identificadas. Estas estão envolvidas na sinalização e crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose.

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). Dentre as citocinas envolvidas na asma 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).

Suas ações são mediadas por intermédio de receptores específicos presentes na superfície de células-alvo e embora tenham efeito sobre as células adjacentes, estas podem agir à distância e ter efeitos sobre as próprias células que as produzem (Hamid e Tulic, 2009).

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), fator de crescimento epidérmico (EGF) e citocinas quimiotáticas ou quimiocinas (RANTES, IL-8) (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).

Tabela 2. Sumário das principais citocinas e seus efeitos (Adaptado de 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

Há evidências de que os mastócitos produzem proteoglicanos e podem também contribuir com a resposta inflamatória, por intermédio da liberação de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IL-4, IL-5, histamina, leucotrienos e prostaglandinas. A IL-4 liberada dos mastócitos serve para perpetuar a produção de IgE e conseqüentemente dos eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5 especificamente recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendele et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010).

Os eosinófilos são granulócitos aproximadamente do mesmo tamanho dos neutrófilos, da linha mielóide. Essas células são encontradas em grande quantidade em órgãos com interface epitelial como o trato gastro-intestinal e trato respiratório, sendo uma condição característica da inflamação alérgica (McFadden e Gilbert, 1992; Hendeles et al., 2004). Podem promover inflamação, alteração vascular, hipersecreção de muco, desprendimento epitelial, aumento da hiper-responsividade das vias aéreas e a obstrução ao fluxo aéreo. Quando ativados, os eosinófilos liberam leucotrienos 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).

Esta fase, conhecida como tardia, ocorre de 3 a 6 horas após o contato com o antígeno (Bousquet et al., 2000). Nela a obstrução brônquica é mais intensa e duradoura, caracterizada por contração da musculatura lisa peribrônquica, infiltrado inflamatório e edema (De Monchy et al., 1985). Pode persistir por horas ou dias, mas com o tratamento adequado muitas vezes resolve-se em até 24 horas.

O desencadeamento de várias respostas tardias, caracterizadas principalmente pela liberação de mediadores inflamatórios, pode em alguns pacientes atingir o epitélio ciliado, ocasionando dano e ruptura. Estas alterações morfofuncionais e na arquitetura da árvore brônquica em resposta a repetitivas injúrias podem contribuir para a não reversibilidade ao fluxo

aéreo, processo conhecido como remodelamento pulmonar (Tiddens et al., 2000; Kumar et al., 2001).

Figura 2. Esquema ilustrativo da cascata inflamatória da asma envolvendo diversas células e mediadores inflamatórios. As respostas alérgicas são predominantemente de perfil Th2. Repetidas crises de inflamação aguda conduzem a inflamação crônica com persistente eosinofilia e/ou neutrofilia nas vias aéreas (Adaptado de Wadsworth et al., 2011).

1.1.5. REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR

O processo de remodelamento como anteriormente citado é resultado da inflamação persistente e caracteriza-se por reconstrução das estruturas do tecido pulmonar de maneira anormal e pode levar a irreversibilidade da obstrução brônquica (Jeffery, 2004). Essa reconstrução anormal é uma tentativa de manter as vias aéreas e o parênquima pulmonar intactos e restringir o processo agressor representado pela resposta inflamatória (Roche et al., 1989; Laitinen et al., 1993; Li e Wilson, 1997). Está associado à reversibilidade ou não do fluxo aéreo, declínio da função pulmonar e gravidade clínica.

Classicamente, o remodelamento das vias aéreas de pacientes com asma incluem danos epiteliais como a diminuição da adesão de células epiteliais, conhecida como fragilidade epitelial, espessamento reticular da membrana basal, fibrose subepitelial com deposição da matriz extracelular (Laitinen et al., 1993), hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas (Ebina et al., 1993), recrutamento e ativação de miofibroblastos, hiperplasia de células caliciformes, hipertrofia das glândulas mucosas e submucosas, angiogênese (Li e Wilson, 1997) e provável transformação direta de células epiteliais em células mesenquimais. Dentre as alterações da matriz extracelular podemos incluir o aumento na deposição de colágeno (Roche et al., 1989) e a fragmentação de fibras elásticas com alterações estruturais presentes também no parênquima pulmonar (Mauad et al., 1999).

As alterações conseqüentes deste processo nos vasos sanguíneos incluem o aumento da vascularização, vasodilatação e insuficiência vascular, além do aumento do número e tamanho dos vasos brônquicos, incluindo pequenos vasos sanguíneos da submucosa. Nos vasos ainda pode ocorrer aumento da permeabilidade e isto pode contribuir para edema na parede da via aérea e obstrução ao fluxo de ar (Khor et al., 2009).

Entre as células envolvidas no processo de remodelamento podemos citar os eosinófilos, os linfócitos T, os mastócitos, as epiteliais, os macrófagos, as células musculares lisas e os fibroblastos (Cho, 2011). Os eosinófilos têm papel chave no processo de remodelamento e fibrose por liberarem citocinas, fatores de crescimento e elastase, além de serem uma fonte de expressão de TGF- β (Vignola et al., 2000).

As células epiteliais das vias aéreas produzem muitos fatores inflamatórios e os danos epiteliais participam do processo pró-inflamatório por meio da ativação de citocinas, fatores de crescimento e mediadores em pacientes asmáticos, como os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento do fibroblasto básico (b-FGF), dentre outros (Tagaya e Tamaoki, 2007). Estes fatores afetam a proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular, entre os quais, o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) que é produzido pelo epitélio das vias aéreas e pode ser uma das mais importantes moléculas no processo de remodelamento. O TGF- β pode ser sintetizado ainda por macrófagos, eosinófilos, linfócitos e fibroblastos, todos aumentados em pacientes

asmáticos. A figura 3 esquematiza as alterações no epitélio brônquico, nos vasos, na musculatura lisa brônquica e matriz extracelular pulmonar decorrentes do processo de remodelamento presentes em pacientes com asma.

Figura 3. Remodelamento das vias aéreas na asma. A ativação do epitélio das vias aéreas por alérgenos e poluentes conduz a efeitos deletérios incluindo inflamação, reparação desregulada, ativação da unidade de desenvolvimento da unidade trófica epitelial- mesenquimal e remodelamento tecidual. (Adaptado de Murdoch e Lloyd, 2010).

Os fibroblastos são freqüentemente encontrados no tecido conectivo e são responsáveis pela produção de uma variedade de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, fibras reticulares e elásticas, laminina, fibronectina, ácido hialurônico, glicoproteínas da substância extracelular amorfa e proteoglicanos (Sheppard e Harrison 1992; Spoelstra et al., 2001). A membrana basal forma uma barreira entre o meio externo e o epitélio de um lado e o interstício do outro. Isto só é possível pela presença dos

componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos (Roche et al., 1989). A alteração no comportamento do fibroblasto parece ser fator imprescindível para que ocorra o remodelamento.

Na asma, além da fibrose subepitelial, ocorre um aumento do número de miofibroblastos, que apresentam um fenótipo intermediário entre fibroblastos e miócitos (células do músculo liso), além de ter a habilidade de secretar proteínas da matriz extracelular e quimiocinas que podem prolongar a sobrevivência de eosinófilos. Batra et al. (2004) demonstraram que a interleucina 4 (IL-4), assim como o TGF- β , estimulam fibroblastos a expressar actina- α do músculo liso em lavado broncoalveolar após desafio com alérgeno em humanos, sugerindo uma importância dos miofibroblastos na patogênese da asma. Além de produzirem colágeno, os miofibroblastos ativados podem ainda contribuir com a inflamação, produzindo diferentes tipos de citocinas e quimiocinas (Spoelstra et al., 2001).

O mecanismo de deposição de matriz extracelular parece ser um balanço entre sua síntese e sua degradação. A deposição de colágeno no tecido é controlada pelo balanço entre as metaloproteinases de matriz que degradam colágeno (MMPs) e seus inibidores, conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Na asma, os membros mais importantes desta família são a MMP-9 e a TIMP-1. O aumento da expressão de TIMP-1 causa deposição de matriz extracelular e espessamento da membrana basal pela inibição da degradação de matriz extracelular. Estudos em indivíduos asmáticos têm mostrado aumento na

produção tanto de MMP-9 quanto de TIMP-1 no muco e no lavado broncoalveolar (Tagaya e Tamaoki, 2007).

A MMP-2 (colagenase A), a MMP-3 (stromelisinase), MMP-9 (gelatinase B) e a MMP-12 (metaloelastase) estão aumentadas em asmáticos, embora a MMP-9 pareça ser a principal (Kelly e Jarjour, 2003), estando aumentada no sangue, no fluido do lavado broncoalveolar, no escarro e em biópsias de asmáticos, inclusive até 24 horas após o desafio antigênico (Atkinson e Senior, 2003).

No pulmão, a MMP-9 pode ser produzida por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e células dendríticas, entre outras (Ohno et al., 1997; Kelly et al., 2000; Atkinson e Senior, 2003; Ohbayashi e Shimokata, 2005). A MMP-9 pode ativar mecanismos de reparo inadequados como a ativação da produção de TGF- β 1 (fator transformador do crescimento beta) aumentando a síntese de colágenos pelos fibroblastos que por sua vez estimula os processos fibróticos (Lee et al., 2001).

Alguns autores sugerem que a degradação dos componentes da matriz extracelular pelas MMPs e outras proteinases, ocorra na fase imediata da asma e a produção aumentada de TIMP-1 possa ocorrer na fase tardia deste processo (Chiappara et al., 2001; Vignola et al., 2003a; Prado et al., 2011a).

Outro importante componente no remodelamento é a elastase, que em concentrações aumentadas degrada as fibras do sistema elástico, sendo os neutrófilos sua principal fonte. Cabe ressaltar que também os macrófagos e eosinófilos produzem elastase (Vignola et al., 1998b; Vignola et al., 2001; Vignola et al., 2003b). Confirmando estes achados, Vignola et al. (2003b)

demonstraram porcentagem aumentada de elastase, de neutrófilos e eosinófilos no escarro induzido de pacientes asmáticos, comparados com indivíduos controle.

Alguns autores têm discutido ainda, que a arginase pode atuar em miofibroblastos aumentando a produção de colágeno, via produção de L-ornitina, contribuindo assim com o processo de remodelamento (Ricciardolo, 2003a; Meurs et al., 2003). A expressão de arginase tipo 1 e tipo 2 foi detectada em fibroblastos do tecido conectivo peribrônquico (Que et al., 1998).

Pesquisas em pacientes asmáticos demonstraram redução dos níveis de arginina no plasma associado a um aumento da atividade da arginase sérica (Morris et al., 2004). Como consequência deste aumento, há maior produção de L-ornitina (Wu e Morris al., 1998; Zimmermann e Rothenberg, 2006) levando a um aumento na síntese e na secreção das collagenases (Prosser e Wahl, 1988), fato relevante também no processo de remodelamento pulmonar.

Muitos estudos prévios sugerem que os efeitos do remodelamento no pulmão são deletérios, por ocasionar excessivo estreitamento das vias aéreas, aumentar a responsividade brônquica, limitar o fluxo aéreo e acelerar o declínio da função pulmonar. Além disso, pulmões de pacientes que morreram de asma fatal apresentaram fortes evidências de alterações ocasionadas pelo processo de remodelamento (Araujo et al., 2008). Entretanto, outros autores vêm considerando um possível papel protetor do remodelamento, sem o qual o paciente estaria gravemente comprometido

pelos sintomas e pela função anormal pulmonar (McParland et al., 2003; James e Wenzel, 2007).

1.1.6. ÓXIDO NÍTRICO, ESTRESSE OXIDATIVO E ASMA

Os primeiros estudos relatando o envolvimento do óxido nítrico (NO) na asma brônquica foram relacionados à presença de altas concentrações desta molécula encontradas no ar exalado de pacientes asmáticos em comparação com indivíduos normais (Persson et al., 1990; Alving et al., 1993).

Esta molécula essencial na fisiologia do corpo humano, é gerada a partir da quebra do grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina por meio de oxidação enzimática (Moncada et al., 1989; Tayeh e Marletta, 1989; Ignarro, 2002), onde há a liberação do NO e da L-citrulina (Culotta e Koshland, 1992; Moncada e Higgs, 1993). A L-arginina, precursora de NO, é transportada para dentro das células, via sistema de transporte aminoácido catiônico (CAT) e pode ser metabolizada por dois grupos distintos de enzimas: as óxidos nítrico sintases (NOS) e a arginase.

As óxidos nítrico sintases convertem a L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina utilizando a NG-hidroxil-L-arginina como intermediário, que por sua vez diminui a atividade da arginase. A L-citrulina pode ser convertida pelo argininosuccinato em L-arginina, enquanto a arginase tem a capacidade de metabolizar a L-arginina em L-ornitina (Ricciardolo et al., 2004). Este processo requer oxigênio como um co-substrato e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como fonte de elétrons para transformar a L-

arginina em L-citrulina e assim liberar o óxido nítrico (Ricciardolo et al., 2004).

Na fisiopatologia da asma sua contribuição para a modulação das alterações funcionais e histopatológicas depende basicamente do tipo de enzima responsável pela sua produção (Ricciardolo, 2003a,b). Alguns autores sugerem que a disfunção das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) parece exercer tanto efeito benéfico quanto maléfico (Xiong et al., 1999; Meurs et al., 2003; Ricciardolo et al., 2004), alterando aspectos relevantes da fisiopatologia da asma, particularmente do recrutamento de células inflamatórias (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009; Prado et al., 2005a,b; Leick-Maldonado et al., 2004), da hiperresponsividade das vias aéreas (Meurs et al., 2002; Marques et al., 2012), e, mais recentemente, do processo de remodelamento (Ricciardolo et al., 2004; Prado et al., 2006 e 2011a).

Assim, por meio de atuação nos nervos do sistema não colinérgico não adrenérgico (NANC), o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico por causar broncodilatação. No entanto, o óxido nítrico derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação nas arteríolas, com conseqüente extravasamento de plasma e edema (Ricciardolo et al., 2004).

Em contraste, o aumento da concentração de NO formado pela enzima NO sintase induzida (iNOS), presente em várias células inflamatórias, resulta em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento de secreção do muco e ativação indireta de células Th2, principalmente por recrutamento eosinofílico, contribuindo para o

agravamento da inflamação (Prado et al., 2011a; Souza et al., 2013; Reis et al., 2012). A hiperemia, o edema e a exsudação, contribuem para o estreitamento da luz das vias aéreas nestes pacientes (Ricciardolo et al., 2004; Starling et al., 2009; Marques et al., 2012).

A iNOS é regulada por vários mediadores incluindo fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon(IFN) γ , interleucina (IL)-1 β , e lipopolissacarídeo (LPS) e pode gerar enormes quantidades de NO comparadas as cNOS (Sugiura e Ichinose, 2011) .

No trato respiratório, a expressão de iNOS tem sido demonstrada nas células epiteliais alveolares (Warner et al., 1995), nos fibroblastos (Romanska et al., 2002), em células do músculo liso das vias aéreas e vasos (Thomae et al., 1993; Griffith et al., 1995), nas células epiteliais das vias aéreas (Adcock et al., 1994; Robbins et al., 1994; Watkins et al., 1997; Pechkovsky et al., 2002), nos mastócitos (Gilchrist et al., 2002), nas células endoteliais (Ermer et al., 2002), nos neutrófilos (Blackford et al., 1994) , em condrócitos (Kobzik et al., 1993), eosinófilos (Del Pozo et al., 1997; Prado et al., 2005 a,b) e em células pneumócitos do tipo II (Sugiura e Ichinose, 2011).

Na asma brônquica, a iNOS apresenta uma ação tóxica e pró-inflamatória exarcebando, perpetuando e amplificando a inflamação (Xiong et al., 1999; Ricciardolo et al., 2004) nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. Sua expressão no trato respiratório pode ser inibida pelo tratamento com corticoterapia (Haddad et al., 1995).

A citotoxicidade do NO resulta então da sua ação direta, da sua concentração local, da enzima pela qual foi produzido e/ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (Schuling et al., 1998).

Quando as células das vias aéreas e dos tecidos são expostas ao estresse oxidativo desencadeado pelo contato com poluentes ambientais, infecções, reações inflamatórias exacerbadas ou mesmo em situações nas quais os sistemas antioxidantes do organismo estão diminuídos, ocorre o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são responsáveis por vários efeitos deletérios nas vias aéreas, induzindo diversas condições patológicas (Wood et al., 2003; Ricciardolo et al., 2004).

Após exposição ao estresse oxidativo, as células inflamatórias e as células residentes nas vias aéreas geram superóxido (O_2^-) por meio da ativação de NADPH oxidase e formam altas quantidades de óxido nítrico por aumento da expressão da iNOS. Assim, na presença de radicais livres de oxigênio, o NO reage com o superóxido, levando a uma maior produção de peroxidonitrito ($ONOO^-$) (Pryor e Squadrito, 1995). Assim, o estresse oxidativo é um importante fator para a amplificação da inflamação nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de pacientes asmáticos (Shiraki et al., 2008; Sugiura e Ichinose, 2011).

O estresse oxidativo pode levar a muitos efeitos prejudiciais na função de vias aéreas, incluindo a contração da musculatura lisa (Rhoden et al., 1989), a indução da hiperrresponsividade de vias aéreas (Weiss et al., 1986;

Katsumata et al., 1990), a hipersecreção brônquica (Doelman e Bast, 1990), a lesão epitelial e a exsudação vascular (Del Maestro et al., 1981; Tate et al., 1982), apresentando um importante papel na fisiopatologia da asma (Doelman e Bast, 1990). Atualmente um método utilizado para quantificar a injúria relacionada ao estresse oxidativo é a mensuração da peroxidação lipídica (Milne et al., 2007).

O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação da membrana celular lipídica, que é responsável pela geração de uma série recentemente descoberta de compostos bioativos, análogos as prostaglandinas, conhecidas como isoprostanos (Morrow, 2006).

Os isoprostanos possuem uma potente atividade biológica e geralmente mediam certos aspectos da lesão oxidativa. A via de formação dos isoprostanos fornece um mecanismo para a geração de várias classes de isoprostanos provenientes do ácido araquidônico, independentes da via da ciclooxygenase (COX), onde os isômeros F2-isoprostano se destacam por terem sido a primeira classe de isoprostanos descoberta (Milne et al., 2008).

Desta forma, esta via tem o potencial de formar 64 estruturas isômeras, sendo o 8-iso-PGF-2 α um dos membros mais característicos da classe F2-isoprostano (Lawson et al., 1999).

No pulmão, podemos detectar isoprostanos em células epiteliais, em macrófagos, no colágeno ao redor das vias aéreas e vasos e também no músculo liso de vias aéreas e vasos (Talati et al., 2006).

Tem sido sugerido que os isoprostanos possam atuar como potentes constritores do músculo liso (Kawikova et al., 1996). Além disso, são

produzidos no tecido das vias aéreas e podem contribuir com os efeitos físicos observados durante a resposta tardia na asma, existindo relação da gravidade da doença com a concentração de 8-epi-PGF₂ α no condensado de ar exalado (Montuschi et al., 1999).

As evidências de que a inflamação, que é característica da asma, resulta em aumento do estresse oxidativo nas vias aéreas, estão se tornando cada vez maiores (Dworski, 2000). Muitos estudos em modelos animais sugerem que ROS podem contribuir com a hiperresponsividade brônquica, pelo aumento do tônus vagal devido ao dano dos receptores β -adrenérgicos sensíveis aos oxidantes e pela diminuição do *clearance* mucociliar.

Desta forma, aspectos do sistema de defesa anti-oxidante, assim como a peroxidação lipídica, são frequentemente utilizados como marcadores indiretos de estresse oxidativo na asma, uma vez que a peroxidação lipídica é de particular significância nesta doença.

Estudos têm demonstrado elevada peroxidação lipídica na asma, mensurada pelo 8-epi-PGF₂ α , sendo que a sua concentração está aumentada em 3-4 vezes em asmáticos persistentes quando comparados aos indivíduos saudáveis (Wood et al., 2000). O aumento de isoprostanos no lavado broncoalveolar e na urina após desafio com alérgeno representa uma evidência de que, na asma induzida por alérgenos, as ROS e a peroxidação lipídica tem papel fisiopatológico significativo. Além disso, o aumento da concentração de isoprostanos no lavado broncoalveolar 24 horas após o desafio alérgeno fornece evidência direta de que os isoprostanos são

produzidos no tecido das vias aéreas e podem contribuir com os efeitos físicos observados durante a resposta tardia da asma (Milne et al., 2008).

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

O NF- κ B é um fator nuclear (NF) que uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 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*), a qual se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra denominada de domínio de dimerização. Nesta última, encontra-se um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal difere entre cada subunidade, sendo que as subunidades p65, c-Rel e RelB contém um domínio de transativação (TAD), necessária para iniciar a atividade transcricional (Hart et al., 1998).

Segundo Tripathi e Aggarwal (2006), independentemente 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.

1.1.7. IMPORTÂNCIA DO PARÊNQUIMA PULMONAR NA FISIOPATOGENIA DA ASMA

Devido às dificuldades de acesso para a avaliação das estruturas da periferia pulmonar, a asma foi considerada durante muito tempo como uma doença que comprometia somente as vias aéreas centrais. Porém o desenvolvimento de novas técnicas de amostras de tecidos e de medidas fisiológicas permitiu mais recentemente, descrever o envolvimento das vias aéreas distais e do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma (Hamid, 2012).

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 mais dramático sobre a patogênese e a resposta ao tratamento da doença (Tulic e Hamid, 2003). Em muitos pacientes asmáticos, esta chamada “zona silenciosa” é um importante local de obstrução ao fluxo aéreo (Yanai et al., 1992; Wagner et al., 1998).

Estudos que utilizaram ressecção cirúrgica de tecido pulmonar (Hamid, 1997), biopsias brônquicas (Kraft, 1999), e também a avaliação de amostras de pulmão pós-morte (Carrol et al., 1997; Mauad et al., 2004) mostraram que alterações semelhantes e até mais graves estende-se das vias aéreas centrais para as distais e parênquima pulmonar em pacientes com asma.

Existem evidências de que a inflamação e o remodelamento pulmonar não ocorrem somente nas vias aéreas centrais, mas também se estendem para a periferia do pulmão (Hamid, 2012).

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. Neste sentido, alguns autores já demonstraram aumento no número de células T (CD₃), eosinófilos total, eosinófilos ativados, assim como 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, 1997, Minshall et al., 1998). Kraft et al. (1996) também mostraram inflamação alveolar em pacientes com asma noturna, o que não ocorre nos indivíduos que apresentam asma não noturna.

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 eram leucócitos e eosinófilos e estavam na região externa à parede da via aérea, definida como a área entre o músculo liso e o alvéolo.

É interessante notar que nas grandes vias aéreas dos mesmos indivíduos a maior 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 traqueo-brônquica pode ser atribuída às diferenças nos mecanismos

de recrutamento de células inflamatórias e/ou às diferenças na produção de citocinas e quimiocinas entre estas regiões, além de diferenças na inervação (Tulic e Hamid, 2003).

Vale ressaltar, que os indivíduos asmáticos com espirometria normal podem apresentar um aumento da resistência das vias aéreas distais em até sete vezes quando comparados aos indivíduos normais (Wagner et al., 1990).

Em pacientes com asma fatal, foram encontradas mudanças na matriz extracelular da parede exterior de pequenas vias aéreas, incluindo aumento na deposição da fibronectina, colágeno do tipo I e II e também aumento na expressão de metaloproteinases (MMP-1, MMP-2 e MMP-9). Também foram encontradas nestas regiões alterações nas ligações alveolares (Dolhnikoff et al; 2009).

Pechkovsky et al. (2010) em seu estudo mostraram que há diferenças regionais entre fenótipo de fibroblastos localizados nas vias aéreas proximais e distais. As células mesenquimais do tecido pulmonar distal tem maior capacidade de se diferenciarem em miofibroblastos em comparação com as proximais e este fator foi atribuído a sua estrutura mais rígida e contrátil e a diferentes respostas ao TGF- β .

Em ratos, 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. Estas alterações apresentaram uma correlação positiva com o aumento da resistência e elâstancia pulmonar, evidenciando que a inflamação, as alterações mecânicas, assim

como o remodelamento, não ocorrem apenas nas vias aéreas, mas também no parênquima.

Em modelos experimentais de inflamação alérgica crônica pulmonar, alterações de responsividade, inflamação, remodelamento e estresse oxidativo foram reproduzidas no parênquima pulmonar distal de cobaias por nosso grupo de pesquisa (Lanças et al., 2006; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009).

O envolvimento do parênquima pulmonar na asma altera o conceito da doença e principalmente as formas de pensar no seu tratamento (Ludwig e Dallaire, 1994). Estes fatos alertam para a possibilidade de sub-tratamento, uma vez que os esteróides inalatórios mais usados atualmente apresentam sua deposição principalmente nas vias aéreas centrais e não na periferia pulmonar (Tulic e Hamid, 2003). Desta forma, um dos desafios terapêuticos da asma tem sido desenvolver novas tecnologias inalatórias que permitam uma melhor oferta de agentes anti-inflamatórios à porção distal do pulmão visando o controle da inflamação e do remodelamento.

1.2. RHO/ RHO QUINASE

1.2.1. ASPECTOS GERAIS

A proteína Rho, pequena GTPase da superfamília Ras, está implicada na regulação de várias funções biológicas e celulares essenciais incluindo adesão, motilidade, contração, migração, aderência e progressão do ciclo da célula (Wettschureck e Offermanns, 2002; Nunes et al., 2010). Além disso, as GTPases tem importante papel em processos celulares complexos tais como, organização do citoesqueleto e alteração da expressão de genes codificantes na proteólise da matriz extracelular (Etienne-Manneville e Hall, 2002).

O gene Rho foi identificado em 1985 e desde então cerca de 20 tipos de Rho GTPases foram descritas em mamíferos: Rho (três isoformas: A,B,C); Rac (1,2,3); Cdc42; TC10; TCL; Chp (1,2); RhoG; Rnd (1,2,3); RhoBTB (1,2), RhoD; Rif; e TTF. Elas alternam entre um estado ativo (GTP) e inativo (GDP) e em seu ciclo ativo interagem com uma das 60 proteínas alvos chamadas de efetoras (Ridley, 2001; Etienne-Manneville e Hall, 2002).

Em 1996, a Rho quinase ou ROCK foi descrita como a proteína alvo (efetora) da Rho A, ou seja, atua facilitando a ativação da Rho de seu estado inativo ligado a guanina difosfato (GDP) para seu estado ativo ligado a guanosina trifosfato (GTP) (Fukata et al., 2001; Henry et al., 2005; Taki et al., 2007). Esta descoberta forneceu informações da ligação entre Rho, formação fibras estresse e contração da célula muscular lisa (Leung et al., 1996 ; Kimura et al., 1996).

A Rho quinase é responsável por afetar a reorganização da actina, a regulação da cadeia leve da miosina (CLM) fosfatase e a fosforilação da CLM. Adicionalmente, parece estar envolvida na regulação da força e da velocidade do cruzamento das pontes de actina e miosina no músculo liso e em células não musculares por inibir a miosina fosfatase mediada pela desfosforilação da cadeia regulatória da miosina II (Wettschureck e Offermanns, 2002). É uma proteína quinase serina/treonina que contém um domínio N-terminal quinase catalítico e pode ser expressa através de duas isoformas: a ROCK 1 (também conhecida como ROCK β ou p160 ROCK) e a ROCK2 (também chamada de ROCK α).

Além da sua ativação pela RhoA, a Rho quinase pode ser ativada no músculo liso pelo ácido araquidônico, em resposta a vários agonistas (Wettschureck e Offermanns, 2002).

Seu ciclo ou a ativação e a inativação da Rho, é regulado em grande parte por três classes de proteínas:

- 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;

- as proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que facilitam a inativação da forma GTP ativa pelo aumento da atividade intrínseca da GTPase na Rho;

- as inibidoras da 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.

A atividade da Rho também pode ser regulada por numerosos receptores de proteína G (Wettschureck e Offermanns, 2002; Schaafsma et al., 2008b). Adicionalmente, a ativação da RhoA é fortemente dependente de sua modificação pós-translacional (isoprenilação) mediada através da atividade de geranylgeranyl transferase (Casey, 1995).

A ativação anormal da via Rho/ Rho quinase tem se mostrado importante no acionamento de vias que contribuem para a fisiopatologia de algumas doenças, tais como: hipertensão arterial e pulmonar, glaucoma, diabetes, disfunção erétil, neurodegeneração e câncer (Nossaman et al., 2010 ; Nunes et al., 2010). No sistema respiratório sua participação vem sendo descrita em doenças como a asma e a DPOC (Fernandes et al., 2007). Na asma acredita-se que a ativação da via da Rho quinase esteja relacionada à limitação ao fluxo aéreo, dessensibilização beta-adrenérgica, recrutamento de eosinófilos e hiperresponsividade e remodelamento das vias aéreas (Kume, 2008).

1.2.2. PRINCIPAIS INIBIDORES DA RHO QUINASE

O envolvimento da via da Rho/Rho quinase na asma tem despertado crescente interesse no potencial farmacológico dos inibidores da ROCK para o tratamento da hiperreatividade brônquica e contração da musculatura lisa. Diversos estudos já foram realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando estes inibidores químicos, principalmente o Y-27632 (Figura 4) e o Fasudil.

O (+)-HÁ-*trans*-4-(1-Aminoetil)-*N*-(4-piridil) cicloexano-carboxamida dihidrocloro (Y-27632), é conhecido como um inibidor altamente seletivo da Rho-quinase quando comparado a outras quinases (Iizuka et al., 2000). É permeável na célula e age como um competidor com o local de ATP na Rho quinase, tendo uma ação inibitória nas suas duas isoformas: ROCK 1 e ROCK 2 (Darenfed et al, 2007; Davies et al., 2000). Este componente inibe a contração do músculo liso e mostra eficácia na normalização da pressão arterial em modelos de hipertensão.

Figura 4. Estrutura do inibidor da Rho-quinase Y-2763 (Adaptado de Uehata et al., 1997).

O HA-1077, também conhecido com AT877 ou cloridrato de fasudil, é reportado como inibidor de diversas proteínas quinases incluindo a Rho quinase com afinidade semelhante ao Y-27632, porém com menor seletividade (Schaafsma et al., 2008b). É atualmente o único inibidor de Rho quinase disponível para uso clínico. Desde 1995 vem sendo utilizado no Japão para prevenção de vasoespasmos em pacientes com hemorragia subaracnóidea (Hirooka e Shimokawa, 2005; Mong e Wang, 2009).

O azaindole e aminofurazam são mais potentes em inibir a ROCK1, porém não foram ainda utilizados para o estudo de doenças das vias respiratórias (Schaafsma et al., 2008b).

1.2.3. RHO QUINASE, MÚSCULO LISO E ASMA

É sabido que em pacientes asmáticos a distensibilidade das vias aéreas pode estar reduzida por fatores relacionados à anormalidade da própria natureza da musculatura lisa e que as vias aéreas destes pacientes são mais estreitas do que as de indivíduos normais (Seow, 2012; Kurashima et al., 2012).

Diversos mecanismos têm sido sugeridos para tentar explicar a hiperresponsividade das vias aéreas, tais como: as alterações do controle neural no músculo liso, o aumento de secreção mucosa e fatores mecânicos relacionados ao processo de remodelamento (Chiba et al., 2008). O entendimento das propriedades do músculo liso pode contribuir para que novas estratégias terapêuticas sejam instituídas no tratamento da asma.

O controle do tônus do músculo liso é vital para a saúde e o Ca^{2+} é um importante mensageiro intracelular responsável pela contração da musculatura lisa. No entanto, a contração pode ocorrer também de forma independente das concentrações intracelulares do Ca^{2+} (Endou et al., 2004; Matthew et al., 2004; Nossaman et al., 2010).

A contração da musculatura lisa é regulada pela fosforilação da cadeia leve da miosina. Quando ocorre aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} é formado o complexo calmodulina que ativa a

mioquinase, ocorrendo a contração do músculo liso devido a fosforilação desta proteína (Kamm e Stull, 1985). A fosforilação da CLM também pode ocorrer quando ocorre a inibição da miofosfatase, atuando no aumento da fosforilação da CLM, independente das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} (Kitazawa et al., 1991).

A utilização do Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e conseqüentemente geração da contração da musculatura lisa é denominada como sensibilização do Ca^{2+} (Kitazawa et al., 1988; Bradley e Morgan, 1986). Os mecanismos que servem de base para esta sensibilização do Ca^{2+} ainda não estão totalmente claros, mas a via Rho/Rho quinase parece estar envolvida neste processo, atuando como inibidores da miofosfatase (Hirata et al., 1992; Gong et al., 1996; Kureishi et al., 1997).

As duas formas de expressão da Rho quinase, chamadas de ROCK1 e ROCK2, inibem a atividade da miofosfatase e promovem a atividade da mioquinase, aumentando a fosforilação e o tônus muscular (Uehata et al., 1997; Kureishi et al., 1997; Fu et al., 1998; Ishizaki et al., 2000). Portanto, podemos concluir que se houver o bloqueio da sinalização da Rho, por meio da Rho quinase, poderíamos esperar que as respostas contráteis do músculo liso fossem atenuadas por meio do mecanismo de inibição da miofosfatase.

Vários estudos apontam a Rho quinase como potencial alvo no tratamento da hiperresponsividade encontrada na asma por ser altamente expressa durante o processo de contração da musculatura lisa das vias

aéreas (Johnston et al., 1995; Sigurs et al., 1995; Rakes et al., 1999; Fernandes et al., 2007; Schaafsma et al., 2008a).

Utilizando o Y-27632 (inibidor específico da Rho quinase) alguns estudos mostraram que esta droga foi capaz de relaxar preparações brônquicas em humanos (Yoshii et al., 1999; Yamagata et al., 2000; Gosens et al., 2004) e inibir o aumento da resistência nas vias aéreas de animais anestesiados (Iizuka et al., 2000; Hashimoto et al., 2002). Inibindo-se a sensibilização do Ca^{2+} , o Y-27632 é capaz de relaxar completamente o músculo liso das vias aéreas (Yoshii et al., 1999; Iizuka et al., 2000). No estudo de Iizuka et al. (2000), os efeitos broncodilatadores do Y-27632 foram obtidos por intermédio da administração da droga via inalatória o que torna ainda mais interessante seu estudo para pacientes asmáticos.

O tônus das vias aéreas é principalmente controlado pelos nervos parassimpáticos e pelo sistema NANC (não adrenérgico- não colinérgico), havendo aumento na liberação destes mediadores em pulmões com inflamação alérgica crônica (Tibério et al., 1997; GINA, 2011; Prado et al., 2005a e 2011a).

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 sensibilização do Ca^{2+} mediada pela via Rho/Rho quinase.

Apesar de o Y-27632, assim como os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos, aumentar 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).

Na asma os vasos pulmonares também apresentam hiperresponsividade a diferentes agonistas vasoconstritores (Witzenrath et al., 2006).

Uehata et al. (1997) descreveram o envolvimento da Rho quinase em modelo experimental de hipertensão. Os pesquisadores mostraram que o uso do inibidor Y-27632 foi capaz de reduzir a pressão sanguínea de ratos hipertensos, mas não a pressão sanguínea de animais normotensos.

Schaafsma et al. (2008a) demonstraram que a inalação com Y-27632, 30 minutos antes e 8 horas após desafio com histamina e ovoalbumina em cobaias sensibilizadas com ovoalbumina, teve efeito broncoprotetor, ocorrendo também redução de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (eosinófilos, macrófagos e neutrófilos). Há evidências do envolvimento de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos em vários processos que podem induzir a hiperresponsividade das vias aéreas na asma (Albertine et al, 2002; Kay, 2005).

O papel do inibidor Rho quinase e seu efeito modulador da resposta inflamatória vêm sendo discutidos de forma promissora, uma vez que seu efeito mantém a integridade da barreira endotelial e, conseqüentemente, controla a inflamação (Schaafsma et al., 2008a). A Rho quinase parece participar na inflamação das vias aéreas, atuando na quimiotaxia de eosinófilos induzida pela eotaxina e na migração de eosinófilos por meio das células endoteliais. Além disso, também está relacionada com células que

participam da inflamação nas vias aéreas, tais como a migração transendotelial de monócitos, de neutrófilos, na polarização e migração de linfócitos T, bem como na regulação de células dendríticas, incluindo mudanças na morfologia celular, adesão, produção de interleucina-12 (IL-12) e interações com células T. Sendo assim, pode-se concluir que a utilização de inibidores da Rho quinase pode ser muito benéfica para pacientes asmáticos atuando como um antiinflamatório (Fernandes et al., 2007).

Taki et al. (2007) administraram oralmente o fasudil, um inibidor específico da Rho quinase, também a ratos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e evidenciaram que o número de células totais e eosinófilos no lavado broncoalveolar foram significativamente atenuados de uma forma dose-dependente. O fasudil causou inibição nos níveis aumentados de IL-5, IL-13 e eotaxina no lavado broncoalveolar. Além disso, o inibidor da Rho quinase foi capaz de suprimir a hiperplasia de células caliciformes, a infiltração de eosinófilos e a responsividade à metacolina nas vias aéreas.

Em 2005 Henry et al. mostraram que o Y-27632 teve um impacto importante no controle da inflamação das vias aéreas. Esta droga ainda foi capaz de inibir a hiperresponsividade a metacolina e serotonina em camundongos alérgicos (Hashimoto et al., 2002; Henry et al., 2005).

É importante destacar que em todos os estudos acima citados, os autores realizaram uma inibição aguda da Rho quinase.

A inibição da Rho quinase também resulta em redução da liberação de IL-2, INF-gama, IL-4 e IL-5 de células T periféricas ativadas em indivíduos normais. Em indivíduos asmáticos, é capaz de reduzir a liberação de IL-4 e

IFN-gama (Aihara et al., 2003). 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 ativação de IFN-gama está relacionado ao aumento da responsividade das vias aéreas (ten Hacken et al., 1998) e ao aumento na produção de IL-4, o que contribui para o excesso de produção de IgE, facilitando a inflamação alérgica em asmáticos (Kawano e Noma, 1995).

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

Os fatores de crescimento estão associados à fisiopatologia da asma, mas a sua ação sobre a musculatura lisa das vias aéreas não está totalmente elucidada. No estudo de Gosens et al. (2004), a ação dos fatores de crescimento IGF-1 e angiotensina II foi quase completamente inibida com a inibição da Rho quinase, indicando que tal proteína pode ser benéfica no tratamento da asma.

Na literatura existem algumas pesquisas sugerindo a atuação da Rho quinase sobre o remodelamento pulmonar (Ediger et al., 2003; Fernandes et al., 2007; Gerthoffer, 2007). Um dos estudos demonstrou que a resposta proliferativa das células musculares lisas das vias aéreas ao ácido

lisofosfatídico (LPA) envolve a ativação da Rho, implicando 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 proliferação de miócitos. Parece também ter um papel no desenvolvimento de fibrose e na migração de células musculares lisas das vias aéreas e fibroblastos. Todas essas ações contribuem para o remodelamento tecidual (Fernandes et al., 2007).

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).

Ming et al. (2002) demonstraram a ligação da Rho quinase com a eNOS em células vasculares endoteliais provenientes do cordão umbilical de humanos. Os autores mostraram que a inibição da via Rho/Rho quinase conduz a uma rápida fosforilação da eNOS, sugerindo um tipo regulação inversa na expressão da eNOS. Portanto, quando houver uma menor expressão de Rho e Rho quinase haverá expressão de eNOS, seguida de vasodilatação de arteríolas e edema, contribuindo para a fisiopatologia da asma. É importante ressaltar que a inibição da iNOS (com o tratamento com 1400W) e de todas as óxido nítrico sintases (com o tratamento com L-NAME) é capaz de reduzir a resposta constritora de vias aéreas e

parênquima pulmonar desencadeadas pelo desafio com antígeno. Acredita-se que parte destes efeitos possa ser decorrente da inibição da Rho quinase (Takemoto et al., 2002; Bolz et al., 2003; Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

Além disso, já foi demonstrada a participação da via Rho quinase na estimulação da proliferação celular de diferentes tipos celulares, incluindo as de carcinoma pulmonar (Han et al., 2005). No entanto, os reais efeitos da inibição da Rho quinase no remodelamento pulmonar ainda não estão totalmente esclarecidos. A figura 5 mostra a representação esquemática da via Rho quinase na contração do músculo liso.

Figura 5. Diagrama mostrando as interações de receptores e operadores dos canais de cálcio e da Rho-quinase na ativação da cadeia leve da miosina durante contração da musculatura lisa das vias aéreas frente a vários agonistas, como os neurotransmissores e mediadores químicos. Abreviações: PLC, fosfolipase C; IP3, inositol trifosfatase; MQ, miosina quinase; CLM, cadeia leve da miosina; CLM-P, cadeia leve da miosina fosfatase; MQ, mioquinase; MF, miosina fosfatase (Adaptado de Nossaman et al., 2010).

1.3. GLUCOCORTICOSTERÓIDES E ASMA

Para o controle dos sintomas de crises asmáticas persistentes, glucocorticoesteróides inalatórios (GCI) ou por via oral são frequentemente utilizados, atuando como potentes drogas antiinflamatórias (Montuschi, 2011). Seu uso diário, isolado ou em combinação com β_2 agonistas de longa duração é recomendado pela *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2011)

Guidelines. Os glucocorticosteróides (GC) atuam por meio da sua ligação aos receptores de glucocorticóides (GRs) no citosol, ativando assim a translocação dos GRs para o núcleo. No núcleo, o GR liga-se a elementos reguladores de genes específicos para induzir a expressão de genes envolvidos na regulação da inflamação das vias aéreas (Jang, 2012).

A introdução dos GCI no tratamento da asma no início dos anos 90 mudou radicalmente o tratamento desta doença. A maioria dos pacientes com asma utilizava GC administrados por via oral e sofriam de efeitos colaterais sistêmicos debilitantes, tais como: osteoporose, hipertensão arterial, diabetes, supressão adrenal hipotalâmico-pituitária, obesidade, catarata, glaucoma, afinamento da pele, levando a estrias cutâneas e fraqueza muscular (GINA, 2011; Louis et al.; 2012).

Os GCIs tem consideravelmente melhorado o controle das crises asmáticas, a função pulmonar e também contribuído para a redução da morbi mortalidade (Louis et al; 2012). Seu uso tem mostrado benefícios na redução do número de linfócitos T, eosinófilos, mastócitos e na manutenção da integridade epitelial em biópsias brônquicas (Laitinen et al.,1992). Foi demonstrado que os GC foram altamente efetivos na inibição do fator de transcrição GATA3, que modula a atividade de células Th2 e liberação de citocinas por estas células (Maneechotesuwan et al., 2009).

Uma das maiores vantagens da terapia inalatória é que a droga atua diretamente na mucosa das vias aéreas, com maiores concentrações locais e menor risco de efeitos colaterais sistêmicos. Altas doses diárias podem estar associadas a adelgaçamento cutâneo, equimoses e, raramente

supressão adrenal. Os efeitos adversos locais incluem candidíase na orofaringe, disfonia e tosse irritativa. Cabe ressaltar que estes efeitos colaterais são contrabalanceados pela alta eficácia da droga e que a lavagem da boca com água depois da inalação diminui o risco de candidíase oral (GINA 2011; Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma, 2012).

No entanto, alguns pacientes (10-25%) mantêm-se sintomáticos apesar de fazer o uso correto da terapia com corticóides (Goleva et al., 2007). Estes pacientes apresentam inflamação das vias aéreas e do parênquima pulmonar persistente. Muitas vezes necessitam de doses inalatórias maiores, corticosteróide oral e associação com outras medicações de controle como β_2 agonista de ação prolongada, anti-leucotrienos e teofilina (Leung e Bloom, 2003).

As razões que explicam o fato de alguns pacientes permanecerem insensíveis aos efeitos da terapia com GC ainda não estão bem entendidas e fatores genéticos podem contribuir em alguns casos (Ito et al, 2006; Barnes, 2011; GINA, 2011). Os mecanismos propostos, que podem levar a resistência ao esteróide na asma, incluem defeitos intrínsecos em células como neutrófilos e mastócitos, anormalidades estruturais das vias aéreas, aumento de mediadores inflamatórios relacionados aos GRs, diminuição do número ou da capacidade de ligação dos GRs, aumento do receptor GR- β , repressão do fator de transcrição, presença de neutrófilos no infiltrado que são células resistentes a esteróides, desbalanço entre acetilação e deacetilação das histonas e remodelamento das vias aéreas (Jang, 2012).

Além disso, pacientes com asma que fumam podem ser relativamente resistentes aos efeitos dos GCI (Tomlinson et al., 2005; Lazarus et al., 2007).

Existem vários fatores que podem contribuir para a resistência ao esteróide, tais como:

- Anormalidades genéticas dos receptores de glucocorticosteróides (GCs);
- Anormalidades farmacocinéticas (efeitos da droga);
- Anticorpos lipocortin-1;
- Efeitos das citocinas de perfil Th2 (IL-2, IL-4 e IL-13);
- Aumento GR- β ;
- Ativação da P38 MAP quinase;
- Redução da secreção de IL-10;
- Aumento da ativação da AP-1 (ativação do terminal Jun-N quinase);
- Anormalidades na acetilação das histonas;
- Estresse oxidativo e tabagismo;
- Infecções virais latentes.

Crises asmáticas não controladas podem levar ao processo de remodelamento pulmonar com conseqüente declínio da função pulmonar (James e Wenzel, 2007). Muitos estudos têm sugerido que CIs não são eficazes para reduzir esta resposta de forma adequada (Adachi et al., 2001; Hoshino et al., 1999). Com o objetivo de entender este fenômeno, Goleva et al (2007) demonstraram que, em pacientes asmáticos não responsivos ao tratamento com corticosteróide, a broncodilatação estava comprometida e esta resposta estava associada com o desequilíbrio entre MMP-9/TIMP-1,

promovendo a atividade proteolítica e assim contribuindo para o remodelamento crônico das vias aéreas.

Em trabalho de revisão, Montuschi (2011) descreveu vários estudos que tentaram correlacionar corticosteróides inalatórios e seus efeitos sobre o remodelamento das vias aéreas. A conclusão foi que os CIs têm efeito benéfico em somente alguns dos componentes estruturais das vias aéreas e que os resultados de sua ação dependem da dose, do tempo de tratamento e da gravidade do paciente. Além disso, há dificuldades na realização dos estudos devido a necessidade de técnicas invasivas como biópsias e broncoscopias em humanos.

Apesar de atualmente os corticosteróides serem considerados como padrão-ouro para o tratamento e controle da asma, seu efeito sobre a inflamação neutrofílica é pequeno. Quando descontinuados levam a deteriorização do controle clínico em semanas a meses e há controvérsias quanto a sua capacidade em prevenir o remodelamento pulmonar. Por estes motivos, esforços de vários grupos de pesquisa vêm sendo realizados na tentativa de buscar novas possibilidades terapêuticas para o controle da doença.

1.4. RELEVÂNCIAS DO MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

Modelos experimentais em asma vêm sendo empregados para investigar novas possibilidades terapêuticas e suas relações entre

inflamação, remodelamento e hiperresponsividade das vias aéreas (Evans et al., 2012; Kumar e Foster, 2012).

É claro que todos os modelos experimentais apresentam limitações, uma vez que as complexidades da doença humana não são reprodutíveis em nenhum animal (Vargaftig, 1999). Sendo assim, a principal desvantagem relacionada ao uso de modelos experimentais é a existência de importantes diferenças entre a espécie humana e os animais utilizados (Gimeno, 2003). Porém, por outro lado, sua utilização permite estudar mecanismos em níveis celulares e moleculares, que por questões éticas, seriam inconcebíveis em seres humanos (Zosky e Sly, 2007; Shin et al., 2009).

A variedade de modelos animais de asma é ampla e envolve diferentes espécies (Jarman e Lamb, 2005). Camundongos, ratos, cobaias, cães, ovelhas, macacos e cavalos têm sido utilizados nos estudos de processos inflamatórios e alterações na função das vias aéreas, apresentando vantagens e desvantagens caso a caso (Shin et al., 2009). Segundo Gimeno (2003), pequenas espécies, como as cobaias, têm sido os animais mais utilizados na última década.

A fisiologia e a anatomia do pulmão da cobaia assemelham-se a dos humanos, incluindo: epitélio pseudoestratificado na traquéia, 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 e recrutamento de diferentes células após desafio (Canning e Chou, 2008). Além disso, na cobaia o pulmão é o órgão primário de

anafilaxia, responde a agentes colinérgicos, apresenta duas respostas (imediate e tardia) de exposição ao antígeno e inflamação pulmonar com eosinófilos e neutrófilos (Shin et al., 2009).

Porém alguns cuidados devem ser tomados durante a escolha do que seria considerado um “modelo ideal” de asma. Entre eles citamos a escolha entre um modelo agudo ou crônico de inflamação. Cabe lembrar, que a resposta inflamatória aguda é limitada as vias aéreas proximais, não estando associada ao remodelamento do tecido pulmonar e o perfil das citocinas apresentam variações de acordo com o número de exposição ao alérgeno (Evans et al., 2012).

O modelo utilizado em nossa pesquisa foi desenvolvido por Tibério et al (1997), e possui características bastante semelhantes a da asma humana. A indução da inflamação acontece através de exposições repetidas a aerossóis de ovoalbumina, com o aumento dos valores máximos de resistência e elastância brônquica e do tecido pulmonar após broncoprovocação com o antígeno, edema peribrônquico, resposta inflamatória eosinofílica e linfocitária CD4⁺ e Th2⁺ e aumento nas concentrações de NO exalado (Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2011a,b ; Reis et al., 2012; Souza et al., 2013).

Demonstramos ainda que o processo inflamatório, a reatividade do tecido pulmonar, o estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular não estão restritos somente as vias aéreas (Tibério et al., 1997; Prado et al., 2006; Prado et al., 2011b), mas também se estende ao parênquima pulmonar (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et

al., 2009), tornando um modelo bastante interessante de inflamação pulmonar alérgica crônica.

1.5. JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

Apesar do tratamento com corticosteróides ser bem estabelecido no controle dos sinais e sintomas da asma há controvérsias quanto à ação sobre a progressão da doença e alguns pacientes não se beneficiam desta terapia. Portanto, através dos dados expostos anteriormente obtidos por meio de revisão da literatura, torna-se relevante a busca e aplicação de novas possibilidades terapêuticas que possam contribuir para o controle da asma brônquica.

Os primeiros estudos com inibidores da Rho quinase demonstraram ser bastante promissores no controle de algumas características fisiopatológicas desta doença. No entanto, nota-se que não há trabalhos que avaliem a importância deste novo grupo de drogas associada aos corticoesteróides, que representa atualmente a principal droga de escolha para pacientes com inflamação crônica.

Baseado nestas considerações e sabendo-se da importância do envolvimento do tecido pulmonar periférico, especialmente em pacientes com apresentação mais grave da doença, resolvemos não focar nosso estudo somente na avaliação das vias aéreas, mas também ampliá-lo estudando também o parênquima pulmonar. Acreditamos ser este um grande diferencial do nosso estudo, tornando-o mais completo por

contemplar dois diferentes compartimentos determinantes na fisiopatogenia desta doença.

2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neste modelo de asma experimental, nossos objetivos foram estudar os efeitos do tratamento com inibidor específico da Rho quinase com e sem associação com corticosteróides em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica, avaliando nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, os seguintes parâmetros:

1. As alterações de mecânica do sistema respiratório e oscilatória do tecido pulmonar periférico desencadeadas pelo desafio antigênico;
2. A medida do óxido nítrico exalado;
3. O recrutamento eosinofílico e a expressão de citocinas inflamatórias (IL2, IL4, IL-5 e IL13 e IFN- γ);
4. As alterações da matriz extracelular, incluindo o conteúdo de fibras colágenas e elásticas, o conteúdo de actina, a expressão de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β ;
5. A resposta do estresse oxidativo por meio da quantificação da expressão celular de iNOS e da avaliação do conteúdo de 8-iso-PGF-2 α ;
6. A expressão celular do NF- κ B.

Além disto, iremos correlacionar as alterações funcionais e as histopatológicas representadas pela resposta inflamatória, de remodelamento e do estresse oxidativo.

3

*MATERIAIS
E MÉTODOS*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 433/11. Parte dos experimentos foi realizado em parceria com pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no Departamento de Fisiologia Respiratória coordenado pela Profa. Dra. Patricia Rocco.

Todos os animais receberam cuidados de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985), sendo que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob efeito de anestesia geral.

3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas cobaias do sexo masculino, de linhagem Hartley, provenientes da empresa MEDLAB Produtos Diagnósticos LTDA, São Paulo, Brasil. O peso médio dos animais no início do protocolo experimental era de 300g a 350g e idade de aproximadamente três semanas. Para este experimento foi utilizado um total de 128 animais.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estudados oito grupos experimentais, sendo que os animais receberam, respectivamente:

- 1) Inalações com soro fisiológico 0,9% estéril (grupo SAL, n=8);
- 2) Inalações com solução de ovoalbumina (grupo OVA, n=8);
- 3) Inalações com soro fisiológico estéril e inalação de Y-27632 após a 5^a inalação (grupo SAL-RHO, n=8);
- 4) Inalações com solução de ovoalbumina e inalação de Y-27632 após a 5^a inalação (grupo OVA-RHO n=8);
- 5) Inalações com soro fisiológico estéril e tratamento com dexametasona i.p. (SAL-C n=8);
- 6) Inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com dexametasona i.p. (OVA-C n=8).
- 7) Inalações com soro fisiológico estéril, Y-27632 após a 5^a inalação e tratamento com dexametasona i.p. (SRC n=8);
- 8) Inalações com solução de ovoalbumina, Y-27632 após a 5^a inalação e tratamento com dexametasona i.p. (ORC n=8);

Todos os grupos mencionados acima foram duplicados e os mesmos tratamentos realizados, com o objetivo de avaliar a mecânica oscilatória do parênquima pulmonar distal.

3.3. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

A indução da inflamação pulmonar alérgica crônica foi realizada conforme descrito previamente e representado na Figura 6 (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). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (30cm x 15cm x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (*Soniclear, São Paulo, Brasil*), capaz de gerar partículas com diâmetro variável de 0,5 a 10µm, com taxa de nebulização de 1ml/min. Foram então submetidos à inalação com aerossol de ovoalbumina (grupo OVA) (*Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA*) diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico-SF) (*Baxter, São Paulo, Brasil*) ou à inalação com soro fisiológico apenas (grupo controle- SAL) por um período máximo de 15 minutos ou até o surgimento de sinais de desconforto respiratório, definido pela presença de tiragem intercostal, tosse, espirros, coriza e/ou cianose. O tempo em que os animais permaneceram em contato com o aerossol foi cronometrado e denominado tempo de inalação (TI). O protocolo de sete inalações no total foi realizado duas vezes por semana durante um período de 4 semanas, com doses crescentes de ovoalbumina (1~5 mg/mL) para evitar tolerância. Nas primeiras quatro semanas (inalações 1-4), a dose de ovoalbumina utilizada 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, SAL-RHO, SAL-C e SRC) foram submetidos ao mesmo protocolo de inalações, mas com salina aerossolizada (Tibério et al., 1997).

Figura 6. Esquema do protocolo de sensibilização e administração do tratamento utilizado. As cobaias foram submetidas a inalações, duas vezes por semana, uma a uma, com doses crescentes de ovoalbumina ou soro fisiológico (NaCl 0,9%). Ao todo, foram realizadas sete inalações, sendo a última 72 horas antes da avaliação da mecânica pulmonar. O tratamento com Y-27632 teve início a partir da 5^a inalação e o tratamento com a dexametasona teve início 24h após a 4^a inalação.

3.4. TRATAMENTO COM INIBIDOR DA RHO QUINASE (Y-27632)

Vinte e quatro horas a partir da quarta 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 1mM de Y-27632 foi capaz de inibir o aumento da resistência pulmonar induzida por acetilcolina sem alterações na pressão arterial média. Estes autores utilizaram 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) mostraram 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. Optou-se 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. TRATAMENTO COM CORTICOSTERÓIDE

Vinte e quatro horas após a quarta inalação com ovoalbumina foi iniciado o tratamento diário de um grupo de cobaias com dexametasona (2mg. kg⁻¹/dia i.p.), que perdurou até o final do protocolo experimental. Nos dias de inalação com ovoalbumina, as cobaias receberam cinco horas antes da exposição ao antígeno, dexametasona (Seco et al., 2000). Em estudo

prévio, utilizando a técnica de anafilaxia passiva cutânea (ACP), observamos um aumento em anticorpos anafiláticos IgG1 em cobaias que receberam quatro inalações com ovoalbumina no final da segunda semana deste protocolo (Ruiz Schütz et al., 2009; Leick-Maldonado et al., 2004).

3.6. MENSURAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EXALADO (NO_{EX})

Setenta e duas horas após a última inalação, as cobaias foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50 mg/kg, via injeção intraperitoneal), traqueostomizadas e mecanicamente ventiladas a 60 respirações/min com um volume corrente de 8 mL/kg usando um ventilador Harvard 683 para pequenos animais (*Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA*). Em seguida, a mensuração do NO_{EX} foi realizada como previamente descrito (Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2005b). Em suma, para obter o NO_{EX}, após a estabilização do animal no ventilador, um balão de coleta foi adaptado à saída expiratória do ventilador por 3 minutos. O NO_{EX} foi medido pela técnica de quimioluminescência usando um analisador de resposta rápida (*Sievers Instruments, Boulder, EUA*). O analisador foi calibrado com uma fonte certificada de NO de 47 partes por bilhão (ppb) (*White Martins, São Paulo, Brasil*) e um filtro de NO (*Sievers Instruments, Boulder, EUA*) para manter o ar inspirado livre óxido nítrico antes de cada medida. O filtro de NO foi acoplado ao ramo inspiratório do ventilador para evitar contaminação ambiental.

3.7. AVALIAÇÃO DA MECÂNICA PULMONAR

3.7.1. MECÂNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Após a mensuração do NO_{EX} , a avaliação mecânica foi realizada. A pressão traqueal (P_{tr}) foi medida com um transdutor diferencial de pressão (Honeywell, EUA) ligado a uma conexão na cânula traqueal. A medida de fluxo aéreo (V') foi obtida usando um pneumotacógrafo (*OEM Medical, Richmond, EUA*) conectado à cânula traqueal e ao transdutor de pressão. As mudanças de volume pulmonar (V) foram determinadas por integração digital do sinal de fluxo aéreo. Foi realizada a média de nove a dez ciclos respiratórios para obtenção de um ponto de dados. Os sinais de P_{tr} , V' e V foram coletados antes e depois do desafio com salina (para os grupos SAL, SAL-RHO, SAL-C e SRC) ou ovoalbumina (para os grupos OVA, OVA-RHO, OVA-C e ORC) e foram armazenados em um microcomputador (Sakae et al., 1994; Tibério et al., 1997; Prado et al., 2005b; Ruiz Schütz et al., 2009). As medidas basais de P_{tr} e V' foram realizadas após a estabilização do animal no ventilador. Após isto, desafios de 2 minutos de inalação com aerossol de ovoalbumina (30 mg/mL) ou salina foram feitos no circuito inspiratório através da entrada de ar do ventilador. As medidas de P_{tr} e V' foram obtidas 1 e 3 minutos após o término do desafio. A elastância (E_{rs}) e resistência (R_{rs}) do sistema respiratório foram obtidas usando a equação do movimento do sistema respiratório: $P_{tr}(t) = E_{rs}.V(t) + R_{rs}.V'(t)$, onde t é tempo. Imediatamente após o fim da avaliação mecânica, uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cmH₂O foi aplicada ao sistema

respiratório e as vias aéreas foram ocluídas no fim da expiração, para manter os pulmões expandidos. Então, as cobaias foram exsanguinadas pela secção da aorta abdominal, a parede torácica anterior foi removida e os pulmões foram retirados em bloco com o coração para os estudos morfométricos e análises histológicas/histoquímicas.

A Figura 7 mostra o esquema para a realização das medidas de mecânica do sistema respiratório e coleta de óxido nítrico no ar exalado.

Figura 7. Esquema demonstrando realização da mecânica do sistema respiratório e coleta de óxido nítrico exalado, onde: FR: frequência respiratória; NO_{EX}: óxido nítrico no ar exalado; Ptr=pressão traqueal; V'=fluxo aéreo; Vt=volume corrente.

3.7.2. MECÂNICA OSCILATÓRIA DO TECIDO PULMONAR

Setenta e duas horas após a sétima inalação, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/Kg i.p.), traqueostomizados e submetidos à laparotomia sendo exsanguinados através de 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*). A fatia de tecido pulmonar periférico foi obtida da região subpleural do lobo inferior esquerdo medindo aproximadamente 10mm x 2mm x 2mm e 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 (López-Aguilar et al., 1998; Romero et al., 2001). Cada uma das pontas do fragmento foi colada com cianocrilato á 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 8). 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 1µg/g. Na outra ponta, que atravessa um orifício na parte inferior do recipiente, 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 foi 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 µm de comprimento, que conectado a um gerador (*Modelo 3030; BK Precision, Chicago, IL*), controla a frequência, amplitude e a forma de oscilação da onda (Romero et al., 2001; Rocco et al., 2001; Xisto et al., 2005; Angeli et al., 2008). A tensão (T)

foi obtida através do movimento do parafuso que efetuou 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 (Et) e resistência (Rt) 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 foram padronizados de acordo com o tamanho de cada fatia de tecido pulmonar. A área de secção transversal (A_0) da fatia de tecido pulmonar foi 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/cm^3 , W_0 é o peso úmido em gramas, e L_r é a tensão em repouso em centímetros. Os valores de resistência (Rt) e elastância (Et) foram multiplicados por L_r/A_0 . A

porcentagem de aumento da resistência (%Rt) e elastância (%Et) em relação a condição basal (pré-desafio com OVA) foram calculadas. Após a oscilação mecânica, as fatias de tecido pulmonar foram fixadas em formol 10% por 24 horas e embebidas em parafina para análise histológica (Nakashima et al., 2008; Angeli et al., 2008; Reis et al., 2012).

Figura 8. 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.

3.8. ESTUDOS MORFOMÉTRICOS

Os pulmões e as fatias pulmonares foram removidos e fixados com formol a 4% e, após 24 horas, transferidos para etanol a 70%. Cortes aleatórios para avaliação das vias aéreas e as fatias de parênquima pulmonar foram processadas para incorporação da parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 5µm de espessura.

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico (CH30, Olympus, Japão) com o retículo de retas e pontos (com 50 retas e 100 pontos) acoplado à ocular, com uma área conhecida, usando a técnica de contagem de pontos e retas (Weibel, 2010).

Avaliação das vias aéreas: o retículo foi acoplado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio, sendo avaliadas aproximadamente três campos de três a cinco vias aéreas, aleatoriamente selecionadas por animal (Figura 9A).

Avaliação do parênquima pulmonar: o retículo foi acoplado na região de parênquima pulmonar, onde foram avaliados dez campos aleatoriamente escolhidos (Figura 9B).

Previamente vários autores já demonstraram que esta técnica de avaliação morfométrica é reprodutível e adequada (Weibel, 2010; Tibério et al., 1997 e 2003; Leick-Maldonado et al., 2004).

Figura 9. Posicionamento do retículo na área de parede da via aérea (A) e no parênquima pulmonar (B) 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 sangüíneo 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 de cada campo. Esta análise foi realizada em todos os campos possíveis de cada lâmina, em um aumento de 200x.

3.8.1. QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS

Os cortes de pulmões (de vias aéreas e parênquima) foram corados com Picrosirius, um método para a identificação de colágeno e com Resorcina-Fucsina de Weigert para identificação de fibras elásticas. Para

detecção destas fibras, os cortes dos pulmões foram analisados no aumento de 400X e a avaliação da proporção de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e/ou septo alveolar foi determinada dividindo o número de pontos coincidindo com as fibras pelo número total de pontos coincidindo com a área de tecido ao redor da parede da via aérea ou no septo alveolar. Os resultados foram expressos em proporção de volume (Prado et al., 2005b; Angeli et al., 2008).

3.8.2. QUANTIFICAÇÃO DE EOSINÓFILOS

Para a avaliação de eosinófilos, os pulmões foram corados com Luna, que identifica os grânulos de eosinófilos (Watanabe et al., 2004). Para a detecção de eosinófilos, os cortes de pulmões foram analisados com aumento de 1000X e a técnica de contagem de células nas vias aéreas e/ou parênquima pulmonar foi determinada pela quantificação do número de pontos que incidiam nas células positivas dentro do campo do retículo dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido presente nesse mesmo campo do retículo. Esta avaliação foi feita tanto nos três campos da parede da via aérea quanto nos dez campos que incidiam nos septos alveolares. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$).

3.8.3. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Ao final de todas as colorações imunohistoquímicas, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia (*Fischer, Darmstad, Alemanha*).

Foi realizada a avaliação imunohistoquímica para detecção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN γ , iNOS, 8-isoprostano-PGF2 α , NF κ B, actina, MMP-9, TIMP1 e TGF- β . As lâminas foram previamente preparadas com 3-aminopropil-trietoxissilano Silano (*Sigma*), contendo os cortes histológicos dos pulmões que foram inicialmente hidratados e submetidos aos seguintes procedimentos:

Etapa 1- Recuperação antigênica

Por intermédio de Proteinase K por minutos (37°C) seguidos de descanso de 20 minutos em temperatura ambiente. Após este período as lâminas foram lavadas em PBS.

Etapa 2- Bloqueio e Incubação com Anticorpo Primário

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (3 x 10 minutos), seguidos de incubação com os anticorpos primários: anti-IL2(sc-7896), anti-IL4(sc-1260), anti-IL5(sc-7887), anti-IL13(sc-1776), anti-IFN γ (sc-8308), anti-NF κ B(sc-109), anti-TGF(sc-1836), anti-MMP9(sc-6840), anti-TIMP1(sc-5538), [sc: *Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., Califórnia, EUA.*], isoprostano PGF2 α (*Oxford Biomedical*

Research, Rochester Hills, MI EUA), iNOS (Lab Vision Products Corporation, Neo Markers, Thermo Fisher Scientific, Fremont, EUA), anti-actina de músculo liso humano (clone 1^a, Dako, A/S, Dinamarca) diluídos em BSA na proporção de 1:400 (IL-2), 1:500 (IL-4), 1:200 (IL-5 e IL-13), 1:150 (IFN γ), 1:250 (iNOS), 1:500 (isoprostano PGF2- α), 1:150 (NF κ B), 1:250 (MMP-9), 1:250 (TIMP-1), 1:1500 (TGF), os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, e as lâminas incubadas durante toda a noite.

Etapa 3- Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo

As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABC Kit Vectastain (Vector Elite-PK-6105 (anti-cabra) PK-6101 (anti-coelho). Apenas para os anticorpos primários anti IL-2 e anti IL-4, após a incubação do anticorpo secundário, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10V 3%, metanol (1:1) (2 x 10 minutos) e posteriormente incubação com o complexo.

Etapa 4- Revelação

Foi feita a lavagem das lâminas em PBS e revelação pelo cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, EUA).

Etapa 5- Contra- Coloração e Montagem da Lâminas

As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em

seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) para microscopia.

As quantificação das células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, INF γ , iNOS, NF κ B, MMP-9, TIMP-1 e TGF β nas vias aéreas e no parênquima pulmonar foi realizada conforme descrito no item “quantificação de eosinófilos”.

A quantificação da positividade para isoprostano PGF 2α e de actina foi obtida pela razão entre o número de pontos que incidiram nas áreas positivas e o número de pontos que coincidiram na área do septo alveolar em aumento de 1000X, sendo os resultados apresentados em porcentagem.

3.9. ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA

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.

3.10. 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. Também foi obtido o coeficiente de correlação de Pearson (R) para avaliar as associações dos parâmetros funcionais e histopatológicos. 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. RESULTADOS

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos controle.

Para melhor visualização gráfica, foi realizada a análise estatística entre os animais pertencentes ao grupo controle (SAL, SAL-RHO, SAL-C e SRC) para todos os resultados descritos abaixo e representados pelo grupo SAL.

4.1. TEMPO DE INALAÇÃO

Não houve diferenças no (TI) entre os grupos estudados até a 4ª inalação e todos os animais permaneceram 15 minutos (900 seg) em contato com o antígeno. Nenhum animal do grupo SAL apresentou desconforto respiratório durante o total das 7 inalações. A Figura 10 mostra o tempo médio de inalação dos cinco grupos experimentais da sétima inalação. Houve uma diminuição no tempo de inalação do grupo OVA ($366,0 \pm 32,59$ seg) comparado ao grupo controle SAL (900,00 seg); $P < 0,001$. Os grupos sensibilizados e tratados com Y-27632, com o corticosteróide e com Y-27632 em associação ao corticosteróide (OVA-RHO: $645,8 \pm 51,9$ seg, OVA-C: $483,04 \pm 42,08$ seg, ORC: $584,13 \pm 52,5$ seg, respectivamente) apresentaram maior TI em relação ao grupo OVA ($P < 0,05$). O grupo sensibilizado que realizou inalação com o inibidor da Rho quinase (OVA-RHO) permaneceu mais tempo em contato com o antígeno do que o grupo sensibilizado que recebeu tratamento com corticóide (OVA-C, $P < 0,05$). A associação do Y-27632 com o corticosteróide (grupo ORC) não aumentou o tempo de inalação

em comparação com os grupos OVA-RHO e OVA-C.

Figura 10. Os valores de tempo de inalação (seg) dos grupos que receberam inalação com ovoalbumina (OVA), tratamento com Y-27632 (OVA-RHO), tratamento com corticosteróide (OVA-C) e ovoalbumina em associação com Y-27632 e corticosteróide (ORC) estão representados neste gráfico de barras paralelas, onde demonstra-se a média $\pm$ erro padrão do tempo em que as cobaias permaneceram em contato com o antígeno na 7ª inalação. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparativamente ao grupo SAL. # $P < 0,05$ comparativamente ao grupo OVA-C.

4.2. ÓXIDO NÍTRICO EXALADO

A Figura 11 mostra os níveis de NO exalado medidos 72 horas após a última inalação com salina ou solução de OVA. Os valores de NO_{EX} foram mais altos no grupo OVA ($30,15 \pm 1,38$ ppb) comparado ao grupo SAL ($15,9 \pm 0,69$ ppb, $P < 0,001$). Houve uma redução no NO_{EX} nos grupos sensibilizados e tratados (OVA-RHO: $21,70 \pm 2,15$ ppb, OVA-C: $23,50 \pm 2,27$ ppb e ORC: $19,40 \pm 1,45$ ppb) comparados ao grupo OVA ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. A associação do inibidor da Rho quinase com o corticosteróide não potencializou a diminuição dos níveis de NO_{EX}.

Figura 11. Gráfico de barras paralelas para a concentração de NO exalado das cobaias anestesiadas. O NO_{EX} foi coletado 72 h após a 7ª inalação (antes do desafio) com salina ou solução de OVA nos cinco grupos experimentais. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparativamente ao grupo SAL.

4.3. AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Não houve diferenças nos valores basais de resistência (Rrs) e elastância (Ers) do sistema respiratório entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

A porcentagem de aumento máximo da Rrs é mostrada na Figura 12A. Houve um aumento significativo da porcentagem de Rrs no grupo OVA ($71,86 \pm 5,97\%$) comparado ao controle (grupo SAL: $2,08 \pm 0,92\%$, $P < 0,05$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor de Rho quinase, com o corticosteróide e as duas drogas associadas atenuou esta resposta (grupo OVA-RHO: $10,74 \pm 4,22\%$, grupo OVA-C: $22,49 \pm 3,12\%$ e grupo ORC: $14,25 \pm 5,79\%$) comparados ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A porcentagem de aumento máximo da Ers é mostrada na Figura 12B. Houve aumento significativo da %Ers no grupo OVA ($72,70 \pm 11,32\%$) comparado ao grupo controle (SAL: $3,20 \pm 0,19\%$, $P < 0,05$). O tratamento com o inibidor da Rho quinase (grupo OVA-RHO: $12,38 \pm 0,92\%$), o tratamento com corticosteróide (grupo OVA-C: $25,22 \pm 2,06\%$) e a associação do Y-27632 com o corticosteróide (grupo ORC: $14,77 \pm 3,27\%$) reduziu esta resposta comparados ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A

B

Figura 12. Valores da média $\pm$ erro padrão pós-desafio com OVA (porcentagem de aumento), de resistência (A) e de elastância (B) do sistema respiratório em cobaias previamente expostas a sete inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico e tratadas com Y-27632 ou com corticosteróide e/ou associação do Y-27632 com corticosteróide. * $P < 0,001$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

4.4. AVALIAÇÃO DA MECÂNICA OSCILATÓRIA DO PARÊNQUIMA PULMONAR

Não houve diferença nos valores basais da resistência tecidual (Rt) e na elastância tecidual (Et) entre os grupos estudados (dados não mostrados).

A porcentagem de aumento máximo da Rt e Et são mostrados na Figura 13A e 13B. Os animais expostos previamente à ovoalbumina apresentaram um aumento na %Rt (OVA: $44,83 \pm 6,33$; OVA-RHO: $16,91 \pm 4,72$; OVA-C: $20,03 \pm 9,30$ e ORC: $11,21 \pm 2,98$) e %Et (OVA: $38,73 \pm 10,36$; OVA-RHO: $22,03 \pm 3,67$; OVA-C: $21,36 \pm 8,59$ e ORC: $19,03 \pm 1,65$) comparados aos animais controle expostos a solução salina %Rt (SAL: $5,54 \pm 2,10$); %Et (SAL: $2,36 \pm 0,41$), ($P < 0,05$ para todas as comparações). Houve diferença entre OVA e os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC, ($P < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A **B**

Figura 13. Valores da média $\pm$ erro padrão pós-desafio com OVA (porcentagem de aumento), de resistência (A) e de elastância (B) teciduais em cobaias previamente expostas a sete inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico tratadas com Y-27632 ou com corticosteróide e/ou associação das do Y-27632 com corticosteróide. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

4.5. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

4.5.1. AVALIAÇÃO DE PROPORÇÃO DE ESTRUTURAS DO PARÊNQUIMA PULMONAR

Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto à proporção de estruturas pulmonares (septo alveolar, vias aéreas e vasos sanguíneos) nas fatias de tecido pulmonar periférico. Na análise, estes fragmentos mostraram uma composição aproximadamente de 90% de alvéolos (SAL: $90 \pm 1.30\%$, OVA: $90.9 \pm 0.56\%$, OVA-RHO: $91.7 \pm 0.99\%$, OVA-C: $93.4 \pm 0.85\%$, ORC: $98.0 \pm 0.68\%$).

4.5.2. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE FIBRAS ELÁSTICAS E COLÁGENAS NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

O volume de proporção de fibras elásticas nas vias aéreas é mostrado na Figura 14. O conteúdo de fibras elásticas foi mais alto nos grupos de animais expostos à ovoalbumina (OVA: $15.58 \pm 3.32\%$; OVA-RHO: $5.53 \pm 0.49\%$; OVA-C: $9.33 \pm 0.67\%$ e ORC: $4.87 \pm 0.52\%$) comparado as cobaias expostas à salina (grupo SAL: $1.41 \pm 0.34\%$; $P < 0.05$). Os animais sensibilizados e tratados com Y-27632 (OVA-RHO), com o corticosteróide (OVA-C) e com o inibidor da Rho quinase e corticosteróide (ORC) apresentaram menor conteúdo de fibras elásticas comparativamente aos animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA, $P < 0.05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. Houve uma tendência na redução do volume de proporção das fibras elásticas nas vias

aéreas quando se associou os dois tratamentos (grupo ORC) em comparação ao grupo OVA-C ($P=0,056$).

A Figura 15 mostra o volume de proporção de fibras elásticas no parênquima pulmonar. Houve um aumento, no conteúdo de fibras elásticas (OVA: $18,45 \pm 0,88\%$; OVA-RHO: $13 \pm 1,45\%$; OVA-C: $12,85 \pm 0,51\%$ e ORC: $8,05 \pm 1,59\%$) no septo alveolar em animais expostos à ovoalbumina comparativamente aos animais expostos ao soro fisiológico (SAL: $9,86 \pm 0,59\%$, $P<0,05$ para todas as comparações). Os animais expostos à ovoalbumina que receberam tratamento com Y-27632 (OVA-RHO), com corticosteróide (OVA-C) e associação do Y-27632 com o corticosteróide (ORC) apresentaram menor quantidade de fibras elásticas no tecido periférico comparado a àqueles que receberam inalação somente com ovoalbumina (OVA, $P<0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. A associação do inibidor da Rho quinase com o corticosteróide não potencializou a diminuição da proporção das fibras elásticas no parênquima pulmonar.

Figura 14. Gráfico de barras paralelas mostrando valores da média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras elásticas nas vias aéreas dos cinco grupos experimentais. Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

Figura 15. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar dos cinco grupos experimentais. Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos demais grupos. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

O volume de proporção de fibras colágenas nas vias aéreas é mostrado na Figura 16. O conteúdo de fibras colágenas foi mais alto nos grupos de animais expostos à ovoalbumina (OVA: $24,86 \pm 3,96\%$; OVA-RHO: $17,99 \pm 0,96\%$; OVA-C: $19,60 \pm 1,89\%$ e ORC: $10,31 \pm 0,97\%$) comparado as cobaias expostas à salina (grupo SAL: $8,93 \pm 0,97\%$; $P < 0,05$). Os animais sensibilizados e tratados com Y-27632 (OVA-RHO), com o corticosteróide (OVA-C) e com o inibidor da Rho quinase mais o corticosteróide (ORC) apresentaram menor conteúdo de fibras colágenas comparado aos animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA, $P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. Houve atenuação na redução da proporção de fibras colágenas nas vias aéreas quando se utilizou a associação do corticosteróide com o inibidor da Rho quinase (grupo ORC) em comparação aos grupos OVA-RHO e OVA-C ($P < 0,05$ para as duas comparações).

A Figura 17 mostra o volume de proporção de colágeno no septo alveolar. Houve um aumento no conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar dos animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA: $20,85 \pm 0,76\%$) comparado ao grupo exposto à salina (grupo SAL: $7,45 \pm 0,55\%$). Os grupos expostos à ovoalbumina que receberam tratamento com Y-27632 (grupo OVA-RHO: $11,64 \pm 0,90\%$), com corticosteróide (grupo OVA-C: $13,76 \pm 0,32\%$) e a associação dos dois tratamentos (grupo ORC: $12,35 \pm 1,73\%$) reduziram o conteúdo de fibras elásticas comparados aos animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA, $P < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. A associação do inibidor da Rho quinase com

o corticosteróide não potencializou a diminuição da proporção das fibras colágenas no parênquima pulmonar.

Figura 16. Média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras colágenas nas vias aeras de cobaias expostas a ovoalbumina ou soro fisiológico e tratadas com Y-27632, com corticosteróide e associação do corticosteróide mais o inibidor da Rho quinase (Y-27632). Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL. # $P < 0,05$ comparados ao grupo OVA-RHO e OVA-C.

Figura 17. Gráfico de barras paralelas da média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras colágenas no septo alveolar de cobaias expostas a ovoalbumina ou soro fisiológico e tratadas com Y-27632, com corticosteróide e associação do corticosteróide mais o inibidor da Rho quinase (Y-27632). Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

4.5.3. AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE VOLUME DE ACTINA NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

A Figura 18 mostra o volume de proporção da actina nos cinco grupos experimentais. Houve um aumento no conteúdo de actina das vias aéreas em animais expostos à ovoalbumina (OVA: $26,68 \pm 3,89\%$) comparado ao grupo que foi exposto somente à solução salina (SAL: $7,91 \pm 0,74\%$, $P < 0,05$). Os animais que foram expostos à ovoalbumina e receberam tratamento (OVA-RHO: $14,16 \pm 1,28\%$, OVA-C: $19,97 \pm 0,94\%$ e ORC: $15,30 \pm 1,23\%$) apresentaram uma diminuição na quantidade de actina nas vias aéreas comparados aos animais do grupo OVA ($P < 0,05$). Houve uma tendência na redução do volume de proporção da actina no grupo OVA-RHO em comparação ao grupo OVA-C ($P = 0,057$). A associação do inibidor da Rho quinase com o corticosteróide não potencializou a redução da proporção de actina.

A Figura 19 mostra o volume de proporção da actina no septo alveolar. Houve um aumento no conteúdo de actina no septo alveolar dos animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA: $11,73 \pm 0,45\%$) comparado ao grupo exposto à salina (grupo SAL: $4,36 \pm 0,31\%$, $P < 0,05$). Os grupos expostos à ovoalbumina que receberam tratamento com Y-27632 (grupo OVA-RHO: $5,40 \pm 0,43\%$), com corticosteróide (grupo OVA-C: $4,86 \pm 0,84\%$) e a associação dos dois tratamentos (grupo ORC: $4,94 \pm 0,90\%$) reduziram o conteúdo de actina comparados aos animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA, $P < 0,001$). Não houve diferenças significativas entre os grupos OVA-RHO e

OVA-C. A associação do inibidor da Rho quinase com o corticosteróide não potencializou a diminuição da proporção da actina no parênquima pulmonar.

Figura 18. Média $\pm$ erro padrão da proporção de volume do conteúdo de actina nas vias aeras de cobaias expostas a ovoalbumina ou soro fisiológico e tratadas com Y-27632, com corticosteróide e associação do corticosteróide mais o inibidor da Rho quinase (Y-27632). Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

Figura 19. Gráfico de barras paralelas da média $\pm$ erro padrão do volume de proporção do conteúdo de actina no septo alveolar de cobaias expostas a ovoalbumina ou soro fisiológico e tratadas com Y-27632, com corticosteróide e associação do corticosteróide mais o inibidor da Rho quinase (Y-27632). Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

4.5.4. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

O valores de densidade de eosinófilos nas vias aéreas dos cinco grupos experimentais é mostrada na Figura 20. Houve um aumento na densidade de eosinófilos em cobaias expostas à ovoalbumina (OVA: $30,77 \pm 6,56$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-RHO: $13,26 \pm 1,39$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $16,83 \pm 4,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$ e ORC: $11,46 \pm 3,74$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparado às cobaias expostas à salina (grupo SAL: $5,05 \pm 1,56$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; $P < 0,05$). Os animais sensibilizados e tratados com Y-27632 (OVA-RHO), com o corticosteróide (OVA-C) e com o inibidor da Rho quinase mais o corticosteróide (ORC) apresentaram menor densidade de eosinófilos comparados aos animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA, $P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. Não houve atenuação na diminuição da densidade de eosinófilos quando associado ao grupo sensibilizado os dois tratamentos (grupo ORC).

A Figura 21 apresenta os valores da densidade de eosinófilos no septo alveolar. Houve aumento na densidade de eosinófilos nos animais expostos à ovoalbumina (OVA: $10,46 \pm 0,98$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) quando comparados aos animais expostos à salina (SAL: $0,85 \pm 0,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Em animais expostos à ovoalbumina, o tratamento com Y-27632 (OVA-RHO: $3,22 \pm 0,27$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), com o corticosteróide (OVA-C: $6,15 \pm 2,19$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e associação do Y-27632 com o corticosteróide

(ORC: $2,73 \pm 1,22$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reduziu o número de eosinófilos no septo alveolar comparado àqueles que receberam inalações somente com ovoalbumina ($P < 0,05$). Houve atenuação na diminuição da densidade de eosinófilos no grupo OVA-RHO em comparação ao grupo OVA-C ($P < 0,05$). A associação dos dois tratamentos (grupo ORC) reduziu o número de eosinófilos em relação ao grupo OVA-C ($P < 0,05$).

Figura 20. Média $\pm$ erro padrão da densidade de eosinófilos nas vias aéreas de cobaias expostas a ovoalbumina ou soro fisiológico e tratadas com Y-27632, com corticosteróide e associação do corticosteróide mais o inibidor da Rho quinase (Y-27632). Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

Figura 21. Gráfico de barras paralelas mostrando média $\pm$ erro padrão dos valores de densidade de eosinófilos no parênquima pulmonar de animais expostos a inalação com ovoalbumina ou soro fisiológico e tratados com Y-27632, com corticosteróide e associação do corticosteróide mais o Y-27632. Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL. + $P < 0,05$ comparativamente ao grupo OVA-C. # $P < 0,05$ comparativamente aos grupos OVA-RHO e ORC.

4.5.5. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 E INF-

GAMA NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

A Figura 22 mostra o número de células positivas para IL-2 nas vias aéreas de todos os grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-2 nas vias aéreas dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $33,07 \pm 3,25$ células/10⁴μm²) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $2,86 \pm 0,72$ células/10⁴μm², $P < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para IL-2 nos grupos expostos à OVA e tratados com Y-27632, com

corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $11,08 \pm 0,87$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $12,47 \pm 0,97$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $10,09 \pm 1,29$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A figura 23 mostra o número de células positivas para IL-2 no parênquima pulmonar dos cinco grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-2 no parênquima pulmonar dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $17,67 \pm 1,65$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $2,07 \pm 0,47$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-2 nos grupos expostos à OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide respectivamente foi reduzido em relação ao grupo OVA (OVA-RHO: $7,36 \pm 0,92$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $9,26 \pm 0,45$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $4,13 \pm 0,60$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Houve potencialização da atenuação das células positivas para IL-2 no grupo ORC quando comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C ($P < 0,05$).

Figura 22. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2. * $P < 0,001$ comparado aos outros OVA-RHO e OVA-C. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

Figura 23. Média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2 no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos outros OVA-RHO e OVA-C. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL. # $P < 0,05$ comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C.

A Figura 24 mostra o número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas dos grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $14,44 \pm 1,16$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $3,19 \pm 0,90$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-4 nos grupos expostos à OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide foi reduzido comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $8,53 \pm 1,13$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $8,13 \pm 1,24$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $5,61 \pm 0,85$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A Figura 25 mostra o número de células positivas para IL-4 no parênquima pulmonar dos cinco grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-4 no parênquima pulmonar dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $17,88 \pm 1,75$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,85 \pm 0,47$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-4 nos grupos expostos à OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide foi reduzido comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $9,24 \pm 1,12$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $8,32 \pm 0,40$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $6,89 \pm 0,96$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), $P < 0,001$. Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Figura 24. Gráfico de barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão das células positivas para IL-4 nas vias aéreas das cobaias. * $P < 0,001$ comparado aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

Figura 25. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão das células positivas para IL-4 no parênquima pulmonar das cobaias. * $P < 0,001$ comparado aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

A Figura 26 mostra o número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas de todos os grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $19,86 \pm 1,99$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $5,17 \pm 0,50$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-5 nos grupos expostos a OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide foi reduzido comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $12,76 \pm 1,33$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $11,65 \pm 2,12$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $9,67 \pm 1,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A Figura 27 mostra o número de células positivas para IL-5 no parênquima pulmonar de todos os cinco grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-5 no parênquima pulmonar dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $11,42 \pm 0,56$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,99 \pm 0,26$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-5 nos grupos expostos à OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide foi reduzido comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $6,04 \pm 0,47$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $7,04 \pm 0,93$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $5,90 \pm 1,00$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

.

Figura 26. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas. * $P < 0,001$ comparado aos outros OVA-RHO e OVA-C. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

Figura 27. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão das células positivas para IL-5 no parênquima pulmonar das cobaias. * $P < 0,001$ comparado aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

A Figura 28 mostra o número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas dos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $10,42 \pm 0,70$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $1,83 \pm 0,49$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-13 nos grupos expostos a OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide foi reduzido comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $5,44 \pm 1,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $6,64 \pm 1,58$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $4,59 \pm 0,68$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A figura 29 mostra o número de células positivas para IL-13 no parênquima pulmonar de todos os cinco grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-13 no parênquima pulmonar dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $10,35 \pm 4,22$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $2,71 \pm 0,39$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-13 nos grupos expostos a OVA e tratados com Y-27632, com corticosteróide e com a associação do Y-27632 e corticosteróide foi reduzido comparativamente ao grupo OVA (OVA-RHO: $3,17 \pm 0,96$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; OVA-C: $3,61 \pm 1,07$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; ORC: $2,62 \pm 0,76$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Não houve diferenças entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Figura 28. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas. * $P < 0,001$ comparado aos outros OVA-RHO e OVA-C. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

Figura 29. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão das células positivas para IL-13 no parênquima pulmonar das cobaias. * $P < 0,001$ comparado aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

Foi observado (Figura 30) aumento do número de células positivas para IFN- γ na parede das vias aéreas de animais expostos às inalações de ovoalbumina não tratados (grupo OVA: $32,14 \pm 1,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos animais do grupo controle (grupo SAL: $10,30 \pm 0,77$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho quinase (OVA-RHO: $19,58 \pm 2,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), com corticosteróide (OVA-C: $18,02 \pm 0,83$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e com a associação do inibidor e corticosteróide (ORC: $12,48 \pm 1,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi observado atenuação das células positivas para IFN- γ comparativamente ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferenças entre o grupo OVA-RHO e OVA-C. Houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C quando comparados ao grupo ORC ($P < 0,05$).

As células positivas para IFN- γ no parênquima pulmonar em todos os grupos experimentais podem ser observados na Figura 31. Houve um aumento no número de células positivas para IFN- γ no parênquima pulmonar do grupo OVA ($27,57 \pm 2,20$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado com ao grupo SAL ($10,34 \pm 1,126$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para IFN- γ nos grupos (OVA-RHO: $18,28 \pm 0,86$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; OVA-C: $19,08 \pm 0,61$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; ORC: $13,81 \pm 0,78$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. Houve potencialização da diminuição das células positivas para IFN- γ no grupo ORC quando comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C ($P < 0,05$).

Figura 30. Gráfico de barras mostrando a média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IFN- γ nas vias aéreas. * $P < 0,001$ comparado aos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL. # $P < 0,05$ comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C.

Figura 31. Média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IFN- γ no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos outros OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL. # $P < 0,05$ comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C.

4.5.6. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

Considerando a expressão de iNOS em células inflamatórias (Figura 32), as cobaias expostas à ovoalbumina mostraram um aumento nas células positivas para iNOS nas vias aéreas (OVA: $15,88 \pm 1,06$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) quando comparados aos animais expostos à solução salina (SAL: $7,71 \pm 0,64$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O tratamento com Y-27632 (OVA-RHO: $9,95 \pm 0,66$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), com o corticosteróide (OVA-C: $10,20 \pm 2,12$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e com corticosteróide associado ao inibidor da Rho quinase (ORC: $9,70 \pm 0,81$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) reduziu o número de células inflamatórias positivas para iNOS em animais expostos à ovoalbumina quando comparado àqueles que receberam somente inalação com ovoalbumina (grupo OVA, $P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

As medidas das células positivas para iNOS no septo alveolar são apresentadas na Figura 33. O número de células positivas para iNOS foi maior nos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (grupo OVA: $8,92 \pm 0,65$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparado aos grupos de animais expostos à salina (SAL: $2,34 \pm 0,29$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; $P < 0,001$) e aos animais expostos à ovoalbumina tratados com Y-27632 (grupo OVA-RHO: $10,37 \pm 0,68$), com corticosteróide (grupo OVA-C: $5,42 \pm 0,94$) e em associação do Y-27632 com o corticosteróide (grupo ORC: $4,67 \pm 0,37$) ($P < 0,05$, para todas as comparações). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Figura 32. Valores de média $\pm$ erro padrão da quantidade de células positivas para iNOS nas vias aéreas dos animais previamente expostos à ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e então tratados com Y-27632, com corticosteróide ou Y-27632 associado ao corticosteroide. * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA, OVA-RHO e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao animais expostos à salina.

Figura 33. Valores de média $\pm$ erro padrão da quantidade de células positivas para iNOS no parênquima pulmonar de cobaias previamente expostos à ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e então tratados com Y-27632, com corticosteróide ou Y-27632 associado ao corticosteroide. * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA, OVA-RHO e ORC. ** $P < 0,001$ comparado ao animais expostos à salina.

Os resultados da avaliação da expressão de 8-iso-PGF2 α estão demonstrados na Figura 34. Observamos um aumento da expressão de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas de cobaias expostas à ovoalbumina (OVA: 27,10 $\pm$ 2,16%) comparativamente às expostas somente à solução salina (SAL: 13,68 $\pm$ 0,42%, $P < 0,001$). O tratamento com Y-27632, com o corticosteróide e a associação das duas medicações reduziu esta resposta em animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA-RHO: 15,57 $\pm$ 2,97%, grupo OVA-C: 15,26 $\pm$ 1,37%, grupo ORC: 13,28 $\pm$ 1,16%, respectivamente) comparado aos animais expostos à ovoalbumina ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os animais dos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Os resultados da avaliação da expressão de 8-iso-PGF2 α estão mostrados na Figura 35. Observamos um aumento da expressão de 8-iso-PGF2 α no septo alveolar de cobaias expostas à ovoalbumina (OVA: 16,88 $\pm$ 1,25%) comparativamente às expostas somente à solução salina (SAL: 2,57 $\pm$ 0,23%, $P < 0,001$). O tratamento com Y-27632, com o corticosteróide e a associação das duas medicações reduziu esta resposta em animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA-RHO: 11,98 $\pm$ 0,45%, grupo OVA-C: 10,14 $\pm$ 0,73%, grupo ORC: 2,18 $\pm$ 0,54%, respectivamente) comparado aos animais expostos à ovoalbumina somente ($P < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. Houve potencialização na atenuação da expressão de 8-iso-PGF2 α no grupo ORC em comparação aos grupos OVA-RHO e OVA-C ($P < 0,05$).

Figura 34. Valores de média $\pm$ erro padrão do conteúdo de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas de cobaias expostas à ovoalbumina ou soro fisiológico e que receberam tratamento com Y-27632, com o corticosteróide ou associação do corticosteróide com o Y-27632. *P<0,001 comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. **P<0,001 comparado aos animais expostos à solução salina.

Figura 35. Valores de média $\pm$ erro padrão do conteúdo de 8-iso-PGF2 α no parênquima pulmonar de cobaias expostas à ovoalbumina ou soro fisiológico e que receberam tratamento com Y-27632, com o corticosteróide ou associação do corticosteróide com o Y-27632. *P<0,001 comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. **P<0,001 comparado aos animais expostos à solução salina. #P<0,05 comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C.

4.5.7. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NF- κ B NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

O número de células positivas para NF- κ B nos cinco grupos experimentais está representado na Figura 36. Observamos um aumento no número de células positivas para NF- κ B nas vias aéreas dos animais do grupo OVA ($15,37 \pm 1,72$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparados com o grupo SAL ($5,12 \pm 0,69$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O número de células positivas para NF- κ B nos grupos OVA-RHO ($6,58 \pm 0,91$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$); OVA-C ($7,29 \pm 1,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ORC ($5,35 \pm 0,89$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) foi menor em comparação ao grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os animais dos grupos OVA-RHO e OVA-C. Não houve atenuação do número de células positivas para NF- κ B no grupo ORC comparados ao grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. Também foi observado (Figura 37) aumento do número de células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar de animais expostos às inalações de ovoalbumina e não tratados (grupo OVA: $16,41 \pm 1,36$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em comparação aos animais do grupo controle (grupo SAL: $3,72 \pm 0,31$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho quinase (OVA-RHO: $9,00 \pm 1,06$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), com corticosteróide (OVA-C: $10,88 \pm 0,96$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e com a associação do inibidor e corticosteróide (ORC: $5,70 \pm 0,94$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) foi observado atenuação das células positivas para NF- κ B comparativamente ao grupo OVA ($P < 0,05$). Não houve diferenças entre o grupo OVA-RHO e OVA-C. Houve potencialização na atenuação de células

positivas para NF- κ B no grupo ORC em comparação aos grupos OVA-RHO e OVA-C ($P < 0,05$).

Figura 36. Gráfico de barras mostrando valores de média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NF- κ B nas vias aéreas. * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado aos animais expostos à solução salina.

Figura 37. Gráfico de barras mostrando valores de média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar. * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado aos animais expostos à solução salina. # $P < 0,05$ comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-C.

4.5.8. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO CELULAR DE MMP-9, TIMP-1 E TGF- β NAS VIAS AÉREAS E NO PARÊNQUIMA PULMONAR

Podemos observar na Figura 38 que houve um aumento significativo no número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas do grupo OVA ($24,01 \pm 1,25$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo SAL ($14,09 \pm 1,25$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). O tratamento com Y-27632, com o corticosteróide e a associação das duas medicações em animais expostos à ovoalbumina reduziu esta resposta (grupo OVA-RHO: $13,19 \pm 1,95$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, grupo OVA-C: $13,36 \pm 0,49$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, grupo ORC: $10,82 \pm 1,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, respectivamente) comparado aos animais do grupo OVA ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa nos animais dos grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Os resultados da avaliação de células positivas para MMP-9 no septo alveolar estão mostrados na Figura 39. Observamos um aumento da expressão de células positivas para MMP-9 no septo alveolar de cobaias expostas à ovoalbumina (OVA: $26,31 \pm 0,80$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparativamente às expostas somente a solução salina (SAL: $13,12 \pm 0,93$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). O tratamento com Y-27632, com o corticosteróide e a associação das duas medicações em animais expostos à ovoalbumina reduziu esta resposta (grupo OVA-RHO: $16,97 \pm 0,84$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, grupo OVA-C: $14,92 \pm 0,81$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, grupo ORC: $13,55 \pm 0,56$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, respectivamente) comparado aos animais somente expostos à ovoalbumina

($P < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Figura 38. Valores de média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas de cobaias expostas à ovoalbumina ou soro fisiológico e que receberam tratamento com Y-27632, com o corticosteróide ou associação do corticosteróide com o Y-27632. * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado aos animais expostos à solução salina.

Figura 39. Valores de média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para MMP-9 no parênquima pulmonar de cobaias que receberam tratamento com Y-27632, com o corticosteróide ou associação do corticosteróide com o Y-27632. * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado aos animais expostos à solução salina.

Na Figura 40 está demonstrado o resultado da avaliação de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas de todos os cinco grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para TIMP-1 no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $15,51 \pm 2,63/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $5,79 \pm 1,00/10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para TIMP-1 nos grupos OVA-RHO ($9,03 \pm 0,53/10^4 \mu\text{m}^2$), OVA-C ($9,82 \pm 1,27/10^4 \mu\text{m}^2$) e ORC ($7,30 \pm 0,98/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

Na Figura 41 estão apresentados os resultados da avaliação de células positivas para TIMP-1 no septo alveolar dos animais expostos à ovoalbumina e não tratados (OVA: $16,09 \pm 1,00$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados ao grupo exposto à inalação com solução salina (SAL: $4,49 \pm 0,82$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Houve redução do número de células positivas para TIMP-1 nos grupos expostos à ovoalbumina e tratados com o inibidor da Rho quinase, corticosteróide e a associação das duas medicações (OVA-RHO: $10,03 \pm 0,63/10^4 \mu\text{m}^2$), (OVA-C: $12,18 \pm 1,27/10^4 \mu\text{m}^2$) e (ORC: $8,32 \pm 1,12/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO e OVA-C. A associação do Y-27632 com o corticosteróide (grupo ORC) potencializou a redução no número de células positivas para TIMP-1 em comparação ao grupo OVA-C ($P < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos ORC e OVA-RHO.

Figura 40. Valores de média $\pm$ erro padrão de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas de cobaias repetidamente expostas a ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com Y-27632 (grupo OVA-RHO) ou corticosteróide (grupo OVA-C) ou suas associações (grupo ORC). * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado aos animais expostos à solução salina.

Figura 41. Valores de média $\pm$ erro padrão de células positivas para TIMP-1 no parênquima pulmonar de cobaias repetidamente expostas a ovoalbumina (grupo OVA) e tratadas com Y-27632 (grupo OVA-RHO) ou corticosteróide (grupo OVA-C) ou suas associações (grupo ORC). * $P < 0,001$ comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. ** $P < 0,001$ comparado aos animais expostos à solução salina. # $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA-C.

Os valores de células positivas para TGF- β nas vias aéreas dos cinco grupos experimentais é mostrado na Figura 42. Observamos que houve um aumento de células positivas para TGF- β em cobaias expostas à ovoalbumina (OVA: $11,80 \pm 1,92$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, OVA-RHO: $6,46 \pm 1,20$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, OVA-C: $7,73 \pm 1,58$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$ e ORC: $5,67 \pm 0,91$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparativamente às cobaias expostas a salina (grupo SAL: $3,94 \pm 0,69\%$; $P < 0,05$). Os animais sensibilizados e tratados com Y-27632 (OVA-RHO), com o corticosteróide (OVA-C) e com o inibidor da Rho quinase e corticosteróide (ORC) apresentaram menor expressão de células positivas para TGF- β quando comparados aos animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA, $P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos OVA-RHO, OVA-C e ORC.

A Figura 43 apresenta os valores da expressão de células positivas para TGF- β no septo alveolar. Houve aumento na expressão de células positivas para TGF- β nos animais expostos à ovoalbumina (OVA: $13,24 \pm 0,77$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) quando comparados aos animais expostos à salina (SAL: $4,90 \pm 0,75$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,001$). Nos animais expostos à ovoalbumina, o tratamento com Y-27632 (OVA-RHO: $6,87 \pm 0,48$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), com o corticosteróide (OVA-C: $6,46 \pm 1,13$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e associação do Y-27632 e corticosteróide (ORC: $5,69 \pm 0,74$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) reduziu o número de células positivas para TGF- β no septo alveolar comparado àqueles que receberam inalações somente com ovoalbumina ($P < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA-RHO, e OVA-C e ORC.

Figura 42. Gráfico de barras mostrando valores de média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β nas vias aéreas. *P<0,001 comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. **P<0,001 comparado aos animais expostos à solução salina.

Figura 43. Gráfico de barras mostrando valores de média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β no parênquima pulmonar. *P<0,001 comparado aos animais do grupo OVA-RHO, OVA-C e ORC. **P<0,001 comparado aos animais expostos à solução salina.

4.6. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

A tabela 3 mostra a análise de correlação da Rrs e da Ers em relação a expressão celular (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e INF- γ), NO_{EX}, eosinófilos, aos marcadores de remodelamento (fibras colágenas e elástica, actina, TGF- β , MMP-9 e TIMP-1) e marcadores de estresse oxidativo (iNOS, NF κ -B e 8-iso-PGF2 α) nas vias aéreas. Foram observadas correlações fortes e significativas entre todos os parâmetros avaliados.

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

(a)

	Rrs	Ers
	Valor R	Valor R
	Valor p	Valor p
Eosinófilos	0,651 0,00188	0,602 0,005
IL-2	0,753 0,000126	0,737 0,000208
IL-4	0,79 0,0000347	0,814 0,0000128
IL-5	0,728 0,000271	0,824 0,00000783
IL-13	0,599 0,00522	0,707 0,000496
INF-γ	0,612 0,0041	0,765 0,0000854
NO_{EX}	0,7 0,000584	0,651 0,00188

(b)

		Rrs		Ers	
		<i>Valor R</i>		<i>Valor R</i>	
		<i>Valor p</i>		<i>Valor p</i>	
Fibras Colágenas		0,493		0,638	
		0,0273		0,00247	
Fibras Elásticas		0,675		0,713	
		0,00108		0,000419	
Actina		0,847		0,837	
		0,00000251		0,00000416	
TGF-β		0,58		0,714	
		0,0073		0,000403	
MMP-9		0,717		0,8	
		0,000377		0,0000232	
TIMP-1		0,446		0,586	
		0,0489		0,00667	

(c)

		Rrs		Ers	
		<i>Valor R</i>		<i>Valor R</i>	
		<i>Valor p</i>		<i>Valor p</i>	
iNOS		0,679		0,736	
		0,000986		0,000216	
NFκB		0,843		0,862	
		0,00000312		0,00000103	
8-iso-PGF2α		0,581		0,726	
		0,00721		0,000294	

A tabela 4 mostra a análise de correlação da Rt e da Et em relação a expressão celular (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e INF- γ), eosinófilos, aos marcadores de remodelamento (fibras colágenas e elástica, actina, TGF- β , MMP-9 e TIMP-1) e marcadores de estresse oxidativo (iNOS, NF κ -B e 8-iso-PGF2 α) no parênquima pulmonar. Houve forte correlação com todos os parâmetros avaliados exceto para eosinófilos com a resistência tecidual e de fibras colágenas, IL-13 e INOS com a elastância tecidual.

Tabela 4. Correlação de Pearson de Rt e Et em relação aos marcadores inflamatórios (a), de remodelamento (b) e estresse oxidativo (c).

(a)

	Rt	Et
	<i>Valor R</i>	<i>Valor R</i>
	<i>Valor p</i>	<i>Valor p</i>
Eosinófilos	0,305 0,0954	0,385 0,0325
IL-2	0,696 0,0000136	0,512 0,00324
IL-4	0,803 0,00257	0,522 0,00257
IL-5	0,743 0,00000172	0,466 0,00821
IL-13	0,572 0,000774	0,269 0,144
INF-γ	0,724 0,0000041	0,516 0,00295

(b)

		Rt		Et	
		<i>Valor R</i>		<i>Valor R</i>	
		<i>Valor p</i>		<i>Valor p</i>	
Fibras Colágenas		0,382		0,317	
		0,0341		0,0824	
Fibras Elásticas		0,668		0,452	
		0,0000398		0,0106	
Actina		0,505		0,428	
		0,00376		0,0163	
TGF-β		0,72		0,514	
		0,0000049		0,00311	
MMP-9		0,667		0,363	
		0,0000418		0,0447	
TIMP-1		0,675		0,528	
		0,0000314		0,00225	

(c)

		Rt		Et	
		<i>Valor R</i>		<i>Valor R</i>	
		<i>Valor p</i>		<i>Valor p</i>	
iNOS		0,465		0,311	
		0,00843		0,0883	
NFκB		0,79		0,452	
		0,00000012		0,0107	
8-iso-PGF2α		0,752		0,438	
		0,00000107		0,0137	

A tabela 5 mostra a análise de correlação do conteúdo de fibras colágenas e elásticas em relação aos eosinófilos e as citocinas de perfil Th1/Th2 celular (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e INF- γ) nas vias aéreas. Foram observadas correlações fortes e significativas entre todos os parâmetros avaliados.

Tabela 5. Correlação de Pearson das fibras colágenas e elásticas em relação às citocinas inflamatórias.

	Fibras colágenas	Fibras elásticas
	Valor R	Valor R
	Valor p	Valor p
Eosinófilos	0,6 0,00513	0,744 0,000169
IL-2	0,616 0,00385	0,799 0,0000235
IL-4	0,682 0,000927	0,685 0,000852
IL-5	0,764 0,0000895	0,67 0,00123
IL-13	0,545 0,013	0,736 0,000219
INF-γ	0,827 0,00000678	0,81 0,0000151

4.7. EFEITOS NA ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA

A anafilaxia cutânea passiva evidenciou aumento nos anticorpos anafiláticos específicos IgG1 entre as cobaias expostas as inalações com ovoalbumina (grupo OVA, titulação máxima de 1:640). Não houve detecção de anticorpos IgG1 no grupo SAL. Esta resposta foi reduzida entre os animais sensibilizados e tratados com Y-27632 (grupo OVA-RHO, titulação máxima de 1:160), com corticoesteróide (grupo OVA-C, titulação máxima de 1:160), Y-27632 associado ao corticosteróide (grupo OVA-C, titulação máxima de 1:20). Não houve reação positiva aos anticorpos IgE.

4.8. AVALIAÇÃO QUALITATIVA

As fotomicrografias representativas das vias aéreas dos animais corados com Picrosirius para o conteúdo de colágeno, Resorcina-fucsina de Weighert para o conteúdo de fibras elásticas e imunohistoquímica para o volume de actina são mostrados na Figura 44. Os conteúdos de fibras colágenas e elásticas assim como o volume de actina estiveram elevados nos grupos de animais expostos a ovoalbumina sem tratamento (grupo OVA; Figuras 44 B, G e L) em comparação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL; Figuras 44 A, F, e K). O tratamento com o inibidor Rho quinase (grupo OVA-RHO; Figuras 44 C, H e M) com o corticosteróide (grupo OVA-C; Figuras 44 D, I, N) e a associação do inibidor com o corticosteróide (grupo ORC; Figuras 44 E, J e O) para as cobaias expostas a ovoalbumina reduziram todas estas respostas. Houve atenuação na redução da proporção de fibras colágenas nas vias aéreas no grupo ORC (Figura 44 E) em comparação aos grupos OVA-RHO (Figura 44 C) e OVA-C (Figura 44 D).

Figura 44. Fotomicrografias representativas das vias aéreas de cobaias coradas com Picrosirius para o conteúdo de colágeno (painéis A-E, 400x), Resorcina-fucsina de Weighert para o conteúdo de fibras elásticas (painéis F-J, 400x), actina (painéis K-O, 400x). Os cinco grupos experimentais estão representados: SAL (painéis A, F, e K), OVA (painéis B, G e L), OVA-RHO (painéis C, H e M), OVA-C (painéis D, I e N) e ORC (painéis E, J e O). Barra de escala = 50 µm.

A Figura 45 mostra fotomicrografias das paredes das vias aéreas de cobaias dos cinco grupos experimentais submetidas à coloração LUNA para a detecção da densidade de eosinófilos e coloração imunohistoquímica para a detecção de iNOS, 8-iso-PGF2 α e NF- κ B. Os animais expostos a ovoalbumina (grupo OVA) apresentaram infiltração eosinofílica intensa (Figura 45 B) e aumento do número de células positivas para iNOS (Figura 45 G), 8-iso-PGF2 α (Figura 45 L) e NF- κ B (Figura 45 Q) em relação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL: Figuras 45 A, F, K e P). O tratamento com Y-27632, com o corticoesteróide e a associação dos dois tratamentos diminuíram a infiltração eosinofílica, (Figuras 45 C, D, E) e o número de células positivas para iNOS (Figuras 45 H, I e J), 8-iso-PGF2 α (Figuras 45 M, N e O) e NF- κ B (Figuras 45 R, S e T) nas cobaias expostas à ovoalbumina, respectivamente.

Figura 45. Fotomicrografias representativas das vias aéreas de cobaias coradas com LUNA (painéis A-E, 400x) e técnica de imunohistoquímica para iNOS (painéis F-J, 400x), 8-iso-PGF2 α (painéis K-O, 400x) e NF- κ B (painéis P-T, 400x). Todos os grupos experimentais estão representados: SAL (painéis A, F, K e P), OVA (painéis B, G, L e Q), OVA-RHO (painéis C, H, M e R) e OVA-C (painéis D, I, N e S), ORC (painéis E, J, O e T). Barra de escala = 50 μ m.

A Figura 46 mostra fotomicrografias representativas de vias aéreas de cobaias coradas para IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13. As cobaias submetidas a inalações com ovoalbumina e não tratadas (grupo OVA) apresentaram aumento proeminente no número de todas as células positivas para citocinas (Figuras 46 B, G, L, Q e V), em relação aos animais não sensibilizados (grupo SAL: Figuras 46 A, F, K, P e U) e aos animais do grupo OVA-RHO (Figuras 46 C, H, M, R e W), que receberam tratamento com o inibidor Rho quinase; do grupo OVA-C (Figuras 46 D, I, N, S e X), que receberam tratamento com corticoesteróide; e do grupo ORC (Figuras 46 E, J, O, T e Y), que receberam o tratamento com o inibidor associado ao corticosteróide. Houve potencialização na diminuição das células positivas para IFN- γ nas vias aéreas no grupo ORC (Figura 46 E) quando comparado aos grupos OVA-RHO (Figura 46 C) e OVA-C (Figura 46 D).

Figura 46. Fotomicrografias da técnica de imunohistoquímica das paredes das vias aéreas para detectar IFN- γ (painéis A-E, 400x), IL-2 (painéis F-J, 400x), IL-4 (painéis K-O, 400x), IL-5 (painéis P-T, 400x) e IL-13 (painéis U-Y, 400x) de cobaias expostas somente a solução salina (painéis A, F, K, P e U) ou ovoalbumina (painéis B, G, L, Q e V). As cobaias tratadas com Y-27632 (painéis C, H, M, R e W), com corticosteroide (painéis D, I, N, S e X) e Y-27632 associado com corticosteroide (painéis E, J, O, T e Y) também estão representadas. Barra de escala = 50 μ m.

As fotomicrografias representativas da coloração imunohistoquímica para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nas vias aéreas dos cinco grupos de animais são mostradas na Figura 47. Houve um aumento no número de células positivas para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nos grupos de animais expostos a ovoalbumina sem tratamento (grupo OVA; Figuras 47 B, G e L, respectivamente) em comparação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL, Figuras 47 A, F e K). O tratamento com Y-27632, com o corticosteróide e associação do Y-27632 com o corticosteróide para as cobaias expostas a ovoalbumina reduziram o conteúdo de células positivas para MMP-9 (Figuras 47 C, D e E), TIMP-1 (Figuras 47 H, I e J) e TGF- β (Figuras 47 M, N e O), respectivamente.

Figura 47. Fotomicrografias da técnica imunohistoquímica das paredes de vias aéreas para detectar MMP-9 (painéis A-E, 400x), TIMP-1 (painéis F-J, 400x) e TGF- β (painéis K-O, 400x). Todos os grupos experimentais são representados: SAL (A, F and K), OVA (B, G and L), OVA-RHO(C, H and M), OVA-C (D, I and N) and ORC (E, J and O). Barra de escala = 50 μ m.

As fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar dos animais corados com Picrosirius para o conteúdo de colágeno, Resorcina-fucsina de Weighert para o conteúdo de fibras elásticas e imunohistoquímica para o volume de actina são mostrados na Figura 48. Os conteúdos de fibras colágenas e elásticas assim como o volume de actina estiveram elevados nos grupos de animais expostos a ovoalbumina sem tratamento (grupo OVA; Figuras 48 B, G e L) em comparação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL; Figuras 48 A, F, e K). O tratamento com o inibidor Rho quinase (grupo OVA-RHO; Figuras 48 C, H e M) com o corticosteróide (grupo OVA-C; Figuras 48 D, I, N) e a associação do inibidor com o corticosteróide (grupo ORC; Figuras 48 E, J e O) para as cobaias expostas a ovoalbumina reduziram todas estas respostas.

Figura 48. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de cobaias coradas com Picrosirius para o conteúdo de colágeno (painéis A-E, 400x), Resorcina-fucsina de Weighert para o conteúdo de fibras elásticas (painéis F-J, 400x), actina (painéis K-O, 400x). Os cinco grupos experimentais estão representados: SAL (painéis A, F, e K), OVA (painéis B, G e L), OVA-RHO (painéis C, H e M), OVA-C (painéis D, I e N) e ORC (painéis E, J e O). Barra de escala = 50 µm.

A Figura 49 mostra fotomicrografias do parênquima pulmonar de cobaias dos cinco grupos experimentais submetidas à coloração LUNA para a detecção da densidade de eosinófilos e coloração imunohistoquímica para a detecção de iNOS, 8-iso-PGF2 α e NF- κ B. Os animais expostos a ovoalbumina (grupo OVA) apresentaram infiltração eosinofílica intensa (Figura 49 B) e aumento do número de células positivas para iNOS (Figura 49 G), 8-iso-PGF2 α (Figura 49 L) NF- κ B (Figura 49 Q) em relação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL: figuras 49 A, F, K e P). O tratamento com Y-27632, com o corticoesteróide e a associação dos dois tratamentos diminuíram a infiltração eosinofílica, (Figuras 49 C, D e E) e o número de células positivas para iNOS (Figuras 49 H, I e J), 8-iso-PGF2 α (Figuras 49 M, N e O) e NF- κ B (Figuras 49 R, S e T) nas cobaias expostas a ovoalbumina, respectivamente. Houve potencialização na atenuação da expressão do conteúdo de 8-iso-PGF2 α e de células positivas para NF- κ B no grupo ORC (Figuras 49 O e T) em comparação aos grupos OVA-RHO (Figuras 49 M e R) e OVA-C (Figuras 49 N e S) e do número de eosinófilos (Figura 49 E) comparado ao grupo OVA-C (Figura 49 D).

Figura 49. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de cobaias coradas com LUNA (painéis A-E, 400x) e técnica de imunohistoquímica para iNOS (painéis F-J, 400x), 8-iso-PGF2 α (painéis K-O, 400x) e NF- κ B (painéis P-T, 400x). Todos os grupos experimentais estão representados: SAL (painéis A, F, K e P), OVA (painéis B, G, L e Q), OVA-RHO (painéis C, H, M e R) e OVA-C (painéis D, I, N e S), ORC (painéis E, J, O e T). Barra de escala = 50 μ m.

A Figura 50 mostra fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de cobaias coradas para IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13. As cobaias submetidas a inalações com ovoalbumina e não tratadas (grupo OVA) apresentaram aumento proeminente no número de todas as células positivas para citocinas (Figuras 50 B, G, L, Q e V), em relação aos animais não sensibilizados (grupo SAL: Figuras 50 A, F, K, P e U) e aos animais do grupo OVA-RHO (Figuras 50 C, H, M, R e W), que receberam tratamento com o inibidor Rho quinase; do grupo OVA-C (Figuras 50 D, I, N, S e X), que receberam tratamento com corticosteróide; e do grupo ORC (Figuras 50 E, J, O, T e Y), que receberam o tratamento com o inibidor associado ao corticosteróide. No grupo ORC houve potencialização na atenuação das células positivas para IFN- γ e IL-2 (Figuras 50 E e J) quando comparado aos grupos OVA-RHO (Figuras 50 C e H) e OVA-C (Figuras 50 D e I).

Figura 50. Fotomicrografias da técnica de imunohistoquímica do parênquima pulmonar para detectar IFN- γ (painéis A-E, 400x), IL-2 (painéis F-J, 400x), IL-4 (painéis K-O, 400x), IL-5 (painéis P-T, 400x) e IL-13 (painéis U-Y, 400x) de cobaias expostas somente a solução salina (painéis A, F, K, P e U) ou ovoalbumina (painéis B, G, L, Q e V). As cobaias tratadas com Y-27632 (painéis C, H, M, R e W), com corticosteroide (painéis D, I, N, S e X) e Y-27632 associado com corticosteróide (painéis E, J, O, T e Y) também estão representadas. Barra de escala = 50 μ m.

As fotomicrografias representativas da coloração imunohistoquímica para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β no parênquima pulmonar dos cinco grupos de animais são mostradas na Figura 51. Houve um aumento no número de células positivas para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nos grupos de animais expostos a ovoalbumina sem tratamento (grupo OVA; Figuras 51 B, G e L, respectivamente) em comparação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL, Figuras 51 A, F e K). O tratamento com Y-27632, com o corticosteróide e associação do Y-27632 com o corticosteróide para as cobaias expostas a ovoalbumina reduziu o conteúdo de células positivas para MMP-9 (Figuras 51 C, D e E), TIMP-1 (Figuras 51 H, I e J) e TGF- β (Figuras 51 M, N e O), respectivamente. A associação do Y-27632 com o corticosteróide (grupo ORC) potencializou a redução no número de células positivas para TIMP-1 (Figura 51 J) em comparação ao grupo OVA-C (Figura 51 I).

Figura 51. Fotomicrografias da técnica imunohistoquímica do parênquima pulmonar para detectar MMP-9 (painéis A-E, 400x), TIMP-1 (painéis F-J, 400x) e TGF- β (painéis K-O, 400x). Todos os grupos experimentais são representados: SAL (A, F and K), OVA (B, G and L), OVA-RHO(C, H and M), OVA-C (D, I and N) and ORC (E, J and O). Barra de escala = 50 μ m.

5

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos em modelo de inflamação alérgica crônica em cobaias o papel da inibição da Rho quinase (Y-27632), dos corticosteróides e a associação dos dois tratamentos nas respostas de mecânica, de inflamação, de remodelamento e do estresse oxidativo nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. Os resultados finais demonstraram que os tratamentos isolados foram eficientes em reduzir as respostas máximas ao desafio com antígeno de resistência e elastância do sistema respiratório e do parênquima pulmonar quando desafiados com antígeno, sugerindo que a Rho quinase ou os corticosteróides modulam a resposta constritora de vias aéreas e do parênquima pulmonar. Houve também redução do NO_{EX}, da infiltração eosinofílica, das citocinas de perfil Th1/Th2, do remodelamento da matriz extracelular, do conteúdo de actina, de células positivas para NFκB e do estresse oxidativo.

Além de controlar todos os parâmetros funcionais, de inflamação, de remodelamento e de estresse oxidativo a associação deste inibidor com o corticosteróide potencializou a redução do conteúdo de colágeno e INF-γ nas vias aéreas e IL-2, IFN-γ, NFκB e do conteúdo de 8-iso-PGF2α no tecido pulmonar distal em comparação com o tratamento isolado do Y-27632 ou somente do corticosteróide.

Ainda no parênquima pulmonar a associação dos dois tratamentos (Y-27632 com corticosteróides) potencializou a redução do número de células

positivas para TIMP-1 e de eosinófilos em comparação aos animais que receberam tratamento somente com corticosteróides.

Ressaltamos que na literatura não existem estudos prévios que associem o tratamento repetido com o inibidor da Rho quinase associado ao corticosteróide como estratégia terapêutica para o controle da mecânica, do remodelamento e de alterações inflamatórias induzidas por inflamação alérgica crônica em vias aéreas e no tecido pulmonar distal.

Após vinte e quatro horas da 4^a inalação com ovoalbumina foi iniciado o tratamento com corticosteróide e Y-27632, com o intuito de não interferir com a sensibilização dos animais. Utilizando a técnica de anafilaxia cutânea passiva, detectamos que os animais sensibilizados apresentavam uma titulação de IgG1 de 1/640. A redução desta resposta ocorreu após os animais serem tratados com o inibidor da Rho quinase, com o corticosteróide e a associação dos dois tratamentos (1/20). Embora o tratamento com o inibidor da Rho quinase associado ou não ao corticosteróide induziram a redução dos anticorpos específicos IgG1, os animais apresentavam ainda significativa titulação de anticorpos anafiláticos.

Ressaltamos que nosso estudo foi baseado no de Possa et al. (2012), que utilizou o mesmo protocolo experimental deste presente estudo e demonstraram que todos os resultados encontrados não são conseqüências da última inalação realizada com o inibidor da Rho quinase no dia da mecânica pulmonar, mas sim do controle de resposta inflamatória e de remodelamento. Passaremos agora a discutir cada um dos aspectos analisados.

RESPOSTA AGUDA DE EXPOSIÇÃO AO ANTÍGENO:

No presente estudo, as respostas agudas da exposição ao antígeno foram avaliadas pelo tempo de inalação. Neste contexto, o tratamento com o inibidor da Rho quinase, do corticosteróide e a associação dos dois tratamentos atenuou esta resposta nos animais sensibilizados.

O uso isolado do Y-27632 aumentou o tempo de contato com o antígeno em comparação ao grupo que recebeu somente tratamento com corticosteróide nos animais sensibilizados. Isto provavelmente ocorreu devido a ação principal de relaxamento muscular do inibidor da Rho quinase (Y-27632) na musculatura lisa das vias aéreas (Schaafsma et al., 2006) e em elementos miocontráteis do parênquima pulmonar, diminuindo os sinais de desconforto respiratório e, portanto, aumentando o tempo de inalação.

Por outro lado, a dexametasona apresenta sua ação principalmente nos elementos inflamatórios da asma (Baterman et al., 2008).

Acreditamos que esta resposta aguda ao desafio com antígeno possa estar relacionada a vários mecanismos, incluindo a contração da musculatura lisa provavelmente modificada pelo tratamento com Y-27632 e ao efeito protetor do corticosteróide (Leick-Maldonado et al., 2004; Possa et al., 2012).

RESPOSTA DO ÓXIDO NÍTRICO EXALADO:

Certificando a eficiência destes três tratamentos no processo inflamatório (do uso isolado do Y-27632, do corticosteróide e a associação dos corticosteróides com o Y-27632), observamos uma redução significativa no nível de NO_{EX} entre as cobaias sensibilizadas com ovalbumina. O NO_{EX} é um biomarcador de inflamação de vias aéreas não invasivo bem estabelecido que pode ser usado para a avaliação da gravidade da asma e da resposta ao tratamento, sendo níveis elevados de NO_{EX} associado a inflamação persistente tanto em humanos (Kharitonov et al., 1994; Bukstein et al., 2011) quanto em modelos animais (Leick-Maldonado et al., 2004; Possa et al., 2012).

Estudos prévios demonstraram que, no mesmo modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica usada neste estudo, o óxido nítrico, derivado de isoformas constitutivas, age como potente broncodilatador, vasodilatador e protetor da deposição de fibras colágenas ao redor das vias aéreas e vasos (Prado et al., 2005a). Além disso, quando inibido exclusivamente o óxido nítrico derivado da isoforma induzida da NO sintase (iNOS), nota-se atenuação da constrição das vias aéreas, da inflamação e dos processos de remodelamento, reduzindo tanto a deposição de fibras colágenas quanto de fibras elásticas tanto nas vias aéreas quanto no parênquima pulmonar distal, sugerindo a contribuição das isoformas de NO na fisiopatogenia da asma (Prado et al., 2006; Starling et al., 2009).

RESPOSTA DA MECÂNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO:

As respostas máxima de elastância e resistência após desafio com antígeno foram significativamente reduzidas tanto no sistema respiratório como no tecido pulmonar distal quando os animais sensibilizados receberam tratamento com o inibidor Y-27632, com corticosteróide e com a combinação dos dois tratamentos comparativamente aos animais que receberam veículo. Há evidências de que a ativação da Rho quinase regula a contratilidade actina/miosina independente do nível de cálcio livre, a expressão de mediadores inflamatórios, e adesão de leucócitos e transmigração através das células endoteliais do pulmão durante a fase inflamatória (Mong et al., 2009).

Os corticosteróides podem modular direta ou indiretamente a contração do músculo liso das vias aéreas suprimindo as respostas agonista induzidas por aumento dos níveis de cálcio intracelular ou por regulação descendente dos receptores desacopladores ligado à contração (muscarínicos M_2 ou M_3 , receptores histamínicos H_1). Além disso, os corticosteróides podem aumentar o relaxamento do músculo liso das vias aéreas por ativar os mecanismos de AMP cíclico-dependente ou independente (Hirst e Lee, 1998).

Y-27632 é um inibidor competitivo de ATP permeável à célula capaz de inibir a ação das Rho quinases I e II relaxando a musculatura lisa vascular e pulmonar. Em doses altas os inibidores da Rho quinase são capazes de inibir outras quinases como a proteína quinase A e a proteína

quinase C, também podem interferir no ciclo celular por meio da inibição da enzima ERK2, p38 e MAPK (Pfeiffer et al., 2004). Alguns estudos prévios corroboram os resultados obtidos no presente trabalho.

Neste sentido, Schaafsma et al. (2006) verificaram que a inalação com o inibidor da Rho quinase causa uma considerável broncoproteção em cobaias sensibilizadas tanto à histamina como ao PGF 2-alfa, comparativamente às condições basais. Os autores demonstraram que o uso do inibidor Y-27632 reverteu a hiperresponsividade das vias aéreas de cobaias sensibilizadas a ambos os agonistas (histamina e PGF 2-alfa) tanto na resposta aguda quanto na tardia.

Schaafsma et al. (2004) também demonstraram que o tônus basal da musculatura lisa das vias aéreas de cobaias, tanto do grupo controle quanto do grupo sensibilizado com ovoalbumina, foi inibido na presença do inibidor da Rho quinase (Y-27632), apontando para a atividade miosinofosfatase da Rho-quinase, que contribui para a contração muscular lisa sob condições de baixa $[Ca^{2+}]_i$, inibida na presença do Y-27632.

Matsumoto et al. (2007) mostraram que as células musculares lisas das vias aéreas de pacientes asmáticos embebidas em gel de colágeno apresentaram aumento da contração desencadeada pela histamina comparativamente aos controles não asmáticos. Além disso, verificaram que a contração das células no gel foi inibida com o uso de um inibidor específico da Rho quinase (Y-27632). Esse achado é consistente com estudos recentes que mostram o papel importante que a Rho quinase exerce na

contração do músculo liso envolvendo a sensibilização do Ca^{2+} , inibição da miosino-fosfatase e fosforilação da cadeia leve de miosina.

Cabe ressaltar que, nestes estudos acima descritos, os autores realizaram a inibição aguda da Rho quinase. Consideramos que a inibição com repetidas doses complementa de maneira fundamental os estudos da potencial importância destes inibidores no tratamento da asma. Além disso, o modelo experimental utilizado apresenta uma resposta inflamatória alérgica crônica.

Considerando os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, os resultados da % de resposta máxima de Rrs e Ers após desafio com antígeno apresentaram uma correlação forte com a redução do conteúdo de eosinófilos, com o NO_{EX} , com o conteúdo de actina, com a expressão de citocinas de perfil Th1 e Th2, com o remodelamento da matriz extracelular e com o estresse oxidativo.

No parênquima pulmonar observamos também uma forte correlação da % de aumento após desafio antigênico com todos os parâmetros avaliados, exceto eosinófilos. Em relação à % de aumento da Et após desafio notamos forte correlação com os todos os parâmetros avaliados, exceto com fibras colágenas, IL-13 e iNOS.

AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ACTINA:

A fim de adicionar explicações aos mecanismos envolvidos no controle das respostas de mecânica, avaliamos o conteúdo de actina nas vias aéreas e no parênquima pulmonar de cobaias sensibilizadas e tratadas. A actina faz parte do citoesqueleto das células endoteliais e na presença de agonistas inflamatórios, há o aumento do cálcio citosólico, diminuindo a cAMP e ativando a RhoA/Rho quinase, gerando a reorganização da actina cortical em fibras de estresse, que são feixes de actina/miosina necessários para induzir a contração celular (Prasain e Stevens, 2009).

Houve uma diminuição no conteúdo de actina do músculo liso na parede das vias aéreas nos três grupos tratados (com o inibidor da Rho quinase, com corticoesteróide e no grupo que houve a associação dos dois tratamentos) comparados ao grupo não tratado. É importante relatar que houve uma tendência na diminuição da proporção da actina nas vias aéreas no grupo OVA-RHO em comparação ao grupo OVA-C ($P=0,057$). Possíveis conclusões destes dados reforçam que a Rho quinase tem papel constritor em vias aéreas e no parênquima pulmonar distal, provavelmente devido a uma interferência na função da actina e também decorrente da presença de elementos miocontráteis no parênquima distal, especialmente os miofibroblastos.

Em 2008a, Schaafsma et al. verificaram os efeitos do pré-tratamento com inibidor da Rho-quinase (Y-27632) no grau de resposta asmática induzida por alérgeno (ovoalbumina) aguda e tardiamente, no

desenvolvimento de hiperresponsividade e na inflamação de vias aéreas de cobaias. Os resultados deste estudo mostraram que o pré-tratamento proporcionou proteção considerável contra o desenvolvimento de hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas antes da resposta aguda e também uma prevenção completa antes da resposta tardia.

Os efeitos da dexametasona no músculo liso das vias aéreas de humanos foram estudados por Goldsmith et al. (2006). Estes autores mostraram que, em células brônquicas de humanos, os corticosteróides reduziram a proteína actina do músculo liso e estes efeitos parecem ser mediados, pelo menos em parte, via atenuação da translação da mRNA e aumento da degradação da proteína.

Resultados de dois diferentes estudos utilizando o mesmo modelo de asma experimental mostraram que, ambos os tratamentos isolados com Y-27632 nas vias aéreas e com dexametasona no parênquima pulmonar distal foram capazes de diminuir o conteúdo de actina, corroborando os nossos achados (Possa et al., 2012; Souza et al., 2013).

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA:

Neste presente estudo, a associação dos dois tratamentos resultou em melhor controle de células positivas para INF- γ nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. Também no parênquima pulmonar observamos maior redução de eosinófilos e IL-2 quando os dois tratamentos foram combinados.

Ainda em relação ao recrutamento eosinofílico, nossos resultados mostraram que no parênquima pulmonar o tratamento isolado com o inibidor da Rho quinase teve maior efeito na diminuição do número de eosinófilos do que o tratamento isolado com corticosteróide, mostrando que o uso isolado desta droga pode ser promissor.

Estes resultados sugerem que a inibição da Rho quinase e os corticosteróides modulam as vias envolvidas no recrutamento de células inflamatórias para vias aéreas e tecido pulmonar distal durante a resposta alérgica inflamatória e que a associação dos dois tratamentos representou em melhor controle do processo inflamatório, principalmente no que diz respeito ao parênquima pulmonar.

Neste sentido, Souza et al (2013) estudaram em tecido pulmonar periférico de cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica os efeitos dos corticosteróides, montelucaste e do 1400W (inibidor seletivo da iNOS). Os resultados mostraram que o uso da dexametasona isoladamente foi capaz de reduzir o infiltrado eosinofílico e a expressão de citocinas Th1 (INF- γ) e Th2 (IL-4 e IL-5), mas que sua associação com o inibidor da iNOS e com o motelucaste potencializou o controle da expressão de IL-4, IL-5 e INF- γ .

Em camundongos expostos cronicamente à ovoalbumina, a administração crônica de budenosida foi capaz de reduzir a hiperreatividade das vias aéreas, assim como a infiltração leucocitária, com decréscimo na produção de mediadores Th2, tais como IL-4, IL-12 e eotaxina-1.

Em relação ao efeito da Rho quinase nesta resposta, os resultados do presente estudo corroboram dados da literatura em relação ao efeito deste

inibidor no recrutamento de eosinófilos. Neste sentido, Taki et al. (2007) estudaram os efeitos da inibição da Rho quinase na eosinofilia e na hiperresponsividade aéreas em ratos desafiados com alérgenos (ovoalbumina). Foi verificado no estudo que o uso do inibidor da Rho quinase Fasudil, assim como também aconteceu com o Y-27632, diminuiu, de forma dose-dependente, o recrutamento de eosinófilos após desafio com alérgeno, apesar de não provocar efeito algum no recrutamento de outras células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, os inibidores da Rho quinase citados acima causaram uma redução na secreção de IL-5 e eotaxina (relacionada à quimiotaxia eosinofílica). Por fim, verificou-se também uma atenuação da hiperplasia celular e da hiperresponsividade aéreas induzida pelo alérgeno.

Aihara M. et al. (2003) demonstraram que a via RhoA está envolvida na ativação de células T por meio de estudo *in vitro* com amostras de linfócitos T de pacientes saudáveis. As amostras foram expostas ao inibidor de Rho quinase e, posteriormente, foram estimuladas por concanavalina A. Os resultados demonstraram uma supressão na secreção de citocinas inflamatórias, demonstrando o papel da Rho quinase na secreção de interleucinas.

Aihara M. et al. (2004) também demonstraram que o papel da RhoA/ROCK na secreção de IFN- γ e IL-4, mediada por TCR (receptor de células T), diferem entre pacientes com asma brônquica e pessoas saudáveis. Os autores demonstraram que a redução na secreção de IL-4 e IFN- γ , por pacientes asmáticos, foram menores do que em sujeitos normais.

Para isto utilizou-se estimulação por concanavalina A (estimula a secreção de citocinas inflamatórias de células T periféricas).

Hashimoto et al. (2002) demonstraram que o inibidor da Rho quinase Y-27632 tem papel importante na redução da infiltração e ativação de células inflamatórias e na redução da produção de superóxido por neutrófilos e eosinófilos, comparando-se amostras de lavado broncoalveolar de cobaias que inalaram ácido lisofosfatídico às cobaias que receberam o ácido e foram tratadas com Y-27632.

Para melhor compreendermos o controle da resposta eosinofílica, expressamos os dados também como percentual de redução do número de eosinófilos em relação ao grupo OVA. O uso do corticosteróide sistêmico, tanto na via aérea (45,5%) quanto no parênquima (41,2%), resultou em uma redução equivalente do número de células. Em relação ao inibidor da Rho quinase, houve uma redução nas vias aéreas de 56,9% do número de eosinófilos no grupo OVA-RHO e de 62,7% no grupo ORC em relação aos animais do grupo OVA. Este percentual de redução foi maior no parênquima (OVA-RHO: 69,2% e ORC:73,8%). Embora o tratamento com o inibidor tenha sido feito por via inalatória, o que aumentaria a probabilidade de maior controle desta resposta nas vias aéreas, cabe ressaltar que a intensidade de resposta eosinofílica nas vias aéreas ($30,77 \pm 6,56$) foi 3x maior do que no parênquima ($10,46 \pm 0,98$). Provavelmente doses maiores e/ou maior número de repetições do tratamento possam se mostrar mais eficazes no controle dessa resposta.

RESPOSTA NO REMODELAMENTO PUMONAR:

Há evidências de que em modelo experimental de inflamação crônica pulmonar e em humanos ocorra aumento do conteúdo de fibras colágenas e elásticas em vias aéreas e parênquima distal (Mauad et al., 2004; Nakashima et al., 2008, Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009). No entanto, não há trabalhos experimentais anteriores avaliando o papel da inibição da Rho quinase associada a corticosteróides na resposta de remodelamento.

Quando avaliamos as alterações de remodelamento da matriz extracelular, particularmente o conteúdo de fibras colágenas e elásticas, TIMP-1, MMP-9 e TGF- β , verificamos diminuição significativa nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho quinase ou com corticosteróides nas vias aéreas e no parênquima pulmonar distal em comparação com os demais grupos. A associação do corticosteróide com o Y-27632 (grupo ORC) acentuou a diminuição do conteúdo de fibras colágenas em vias aéreas além de, uma tendência à diminuição do conteúdo de fibras elásticas ($P=0,056$) comparado aos animais sensibilizados com ovoalbumina e tratados somente com o inibidor (grupo OVA-RHO).

Na avaliação de células positivas para TIMP-1 no parênquima pulmonar observamos uma maior atenuação destas células quando as duas drogas foram associadas comparativamente ao grupo que recebeu tratamento isolado com corticoesteróides.

A potencialização na diminuição das fibras colágenas e a tendência desta diminuição das fibras elásticas nas vias aéreas quando os dois

tratamentos foram combinados pode ser explicada pelo menos em parte, pela redução do número de eosinófilos e de citocinas Th1/Th2, como demonstrado pelos dados de correlação.

de Magalhães Simões et al. (2005) estudaram a distribuição de células inflamatórias em biópsias de pulmão de pacientes vítimas de asma fatal. Estes autores concluíram que o parênquima pulmonar distal apresenta menor densidade de eosinófilos em comparação com área interna das grandes vias aéreas, atribuídas a diferentes tipos de irrigação sanguínea e diferentes áreas de exposição ao antígeno. Reduzindo o número de células inflamatórias, a inibição da Rho quinase pelo Y-27632 em associação ou não com corticosteróides contribuiu para reduzir a inflamação crônica e indiretamente para a redução do remodelamento, o que pôde ser evidenciado pela diminuição do conteúdo de fibras colágenas e elásticas na área de parede das vias aéreas e tecido pulmonar distal.

Alguns estudos sugerem a importância da modulação da Rho quinase no processo de remodelamento. Zhou et al. (2011) analisaram os efeitos do Fasudil sobre a proliferação de fibroblastos cardíacos induzida pela glicose, bem como na produção de colágeno. Os autores demonstraram 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.

Kondrikov et al. (2011), por sua vez, investigaram as funções da Rho quinase e de espécies reativas de oxigênio (ROS) na síntese de colágeno

tipo I em fibroblastos pulmonares expostos à hiperóxia em um modelo de camundongos expostos à 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.

Alguns estudos sugerem que os corticóides inalatórios não são capazes de reduzir totalmente as repostas de remodelamento pulmonar (Adashi et al., 2001; Hoshino et al., 1999). Neste sentido em Goleva et al. (2007), mostraram que em pacientes asmáticos resistentes ao tratamento com esteróides, havia um desequilíbrio entre MMP-9/TIMP-1, promovendo atividade proteolítica e contribuindo para o remodelamento crônico de vias aéreas e não reversibilidade da musculatura lisa brônquica ao fluxo aéreo.

Chakir et al. (2003), estudaram biópsias brônquicas de pacientes com asma moderada e grave tratados com corticosteróide oral durante duas semanas. Os resultados deste estudo mostraram que este tempo de tratamento não foi hábil a diminuir a expressão de colágeno do tipo I e III e também do TGF- β . Em contraste, em outro estudo beclometasona na dose de 800mg diariamente por seis meses diminuiu a deposição de colágeno em pacientes com asma (Hoshino et al., 1999).

Miller et al. (2006) demonstraram que os corticosteróides inibem a expressão de TGF beta1 em eosinófilos e macrófagos. MacMillan et al. (2005) mostraram que, em camundongos expostos cronicamente a ovoalbumina, que a administração crônica de budesonida foi capaz de

reduzir a deposição de colágeno e a produção de muco. Os autores concluíram que o uso da budenosida modula a progressão do remodelamento das vias aéreas pela regulação da inflamação e da sinalização para TGF beta1, e não pela diminuição da produção de TGF beta em nível protéico.

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO:

Avaliando a importância da ativação do estresse oxidativo também demonstramos uma atenuação do número de células positivas para iNOS e do conteúdo de 8-iso-PGF2 α em animais sensibilizados e tratados isoladamente com o inibidor da Rho quinase (Y-27632) ou somente com corticosteróides.

Quando associamos os dois tratamentos, ou seja, o inibidor juntamente com o corticóide, todos estes parâmetros avaliados também diminuíram, porém, houve uma redução mais expressiva do 8-iso-PGF2 α no tecido pulmonar distal.

Está claramente demonstrado que a ativação da iNOS pode contribuir para a formação de peroxinitrito, que é um agente oxidante formado pela interação entre NO e superóxidos. Subseqüentemente, a formação de isoprostano pode resultar de peroxidação lipídica induzida pela formação de peroxinitrito (Hickman-Davis et al., 1999; Mong et al., 2009).

A redução de células positivas para iNOS, pode ter contribuído para a atenuação da hiperresponsividade das vias aéreas e do parênquima

pulmonar, do estresse oxidativo e, conseqüentemente do remodelamento da matriz extracelular. Em 2011a, Prado et al., mostraram que a inibição da iNOS reduz MMP-9, TIMP-1 e TGF- β no parênquima pulmonar, o que mais uma vez reforça que a redução da via do estresse oxidativo possa também ter contribuído para a atenuação do remodelamento na matriz extracelular.

McGown et al. (2011) avaliaram se o inibidor da Rho quinase Fasudil protege contra insuficiência vascular e adesão de leucócitos induzidas por LPS por meio da via NOS. Os autores demonstraram que o Fasudil diminuiu a super-regulação da iNOS induzida por LPS, reduzindo a inflamação microvascular.

Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos exatos de ação do Y-27632 sobre o óxido nítrico e o estresse oxidativo, mas acreditamos que a redução das respostas eosinofílicas e Th2 são responsáveis por estes achados, como demonstrado em estudos prévios (Starling et al., 2009; Angeli et al., 2008). De fato, parece haver uma relação entre esses mediadores e a Rho quinase. Jiang e George (2011) demonstraram que a inibição da Rho quinase com Y-27632 preveniu a redução de NO induzida pelo TGF- β 2, evitando a inibição da iNOS, e sugerindo que o TGF- β 2 inibe a expressão de iNOS por intermédio de uma via Rho quinase-dependente, nas células epiteliais pulmonares.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO CELULAR NF- κ B:

Observamos que a expressão celular de NF- κ B foi reduzida nos animais tratados com o inibidor da Rho quinase e com os corticosteróides quando estes tratamentos foram realizados isoladamente nos animais sensibilizados com ovoalbumina. A associação dos dois tratamentos permitiu que a redução do NF- κ B fosse potencializada no tecido pulmonar distal.

O fator de transcrição nuclear NF κ B é tem papel importante na resposta alérgica. É considerado um mediador central da inflamação na asma pois é capaz de regular a expressão de uma série de genes que estão envolvidos na patogênese das doenças pulmonares (Gosens et al., 2004; Charokopos et al., 2009). Em ratos desafiados com ovoalbumina, Lin et al. (2000) verificaram que os fragmentos pulmonares desses animais exibiam uma alta atividade de NF- κ B.

Vários estudos mostraram que os corticosteróides inibem a ativação de NF- κ B em células musculares lisas (Kang et al., 2008). O estudo de Hancox et al. (1999) em biópsias brônquicas de seres humanos mostrou que o tratamento com budenosida reduziu a ligação entre NF- κ B e o DNA (Hancox et al., 1999). Da mesma forma, Goto et al. (2010) utilizaram culturas de células musculares lisas brônquicas de seres humanos para estudar os efeitos da prednisolona no fator de transcrição NF- κ B. Os achados sugeriram que a prednisolona pode inibir a transcrição NF- κ B induzida através da interação com o receptor corticóide, resultando em uma inibição da regulação da Rho induzida por IL-13 e TNF- α .

Meyer-Schwesinger et al. (2009), avaliando a função da Rho quinase na lesão renal inflamatória em camundongos, verificaram que a inibição da Rho quinase esteve relacionada a atenuação da expressão de NF- κ B , resultando em proteção contra a lesão. Estes dados sugerem que a expressão de NF- κ B seja também Rho quinase-dependente.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO:

O estudo apresentado tem algumas limitações. Foi usada a inibição da Rho quinase com Y-27632 e o tratamento com corticoesteróide em um modelo experimental de inflamação crônica das vias aéreas e de parênquima pulmonar. Uma única dose de inibidor da Rho e de corticosteróide foi testada e, outros mediadores podem também ser responsáveis pelas respostas e não foram avaliados.

É necessário cautela na extrapolação dos atuais achados diretamente aos seres humanos. No entanto, os presentes resultados reforçam a importância da Rho quinase na hiperresponsividade das vias aéreas e de parênquima pulmonar, nas respostas inflamatórias pulmonares, no remodelamento da matriz extracelular e na via do estresse oxidativo. Além disso, é importante lembrar que o modelo com cobaias é um dos melhores modelos animais para o estudo da asma, devido a fatores como anatomia pulmonar semelhante a dos seres humanos e a presença de algumas das características da asma humana, como resposta inflamatória eosinofílica e processo de remodelamento (Ricciardolo et al., 2004). De qualquer forma,

estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações.

6

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica concluímos que:

- 1) A inibição isolada da Rho quinase ou o tratamento com corticoesteróides foram eficazes em:
 - 1a) diminuir a mecânica do sistema respiratório e do tecido pulmonar distal desencadeadas pelo desafio antigênico;
 - 1b) diminuir os níveis de óxido nítrico exalado;
 - 1c) diminuir o recrutamento eosinofílico e expressão de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ nas vias aéreas e no parênquima pulmonar;
 - 1d) modular o remodelamento da matriz extracelular das vias aéreas e do parênquima pulmonar, caracterizado pela redução de fibras colágenas, elásticas, TGF- β , TIMP-1 e MMP-9.
 - 1e) atenuar o estresse oxidativo em decorrência da diminuição da expressão celular de INOS e da avaliação do conteúdo de 8-iso-PGF-2 α nas vias aéreas e no parênquima pulmonar;
 - 1f) diminuir a expressão celular do NF- κ B nas vias aéreas e no parênquima pulmonar.

2) A associação do inibidor da Rho quinase e corticosteróide reduziu todos os parâmetros funcionais e histológicos, além de potencializar a diminuição:

2a) do conteúdo de fibras colágenas e da expressão celular de INF- γ nas vias aéreas e IL-2, IFN- γ , NF- κ B e do conteúdo de 8-iso-PGF 2α no parênquima pulmonar em comparação com o tratamento isolado do Y-27632 ou somente do corticosteróide.

2b) do número de células positivas para TIMP-1 e de eosinófilos no parênquima pulmonar em comparação aos animais que receberam tratamento somente com corticosteróides.

3) Em relação aos mecanismos envolvidos notamos que:

Houve uma forte correlação das alterações da mecânica do sistema respiratório com o óxido nítrico exalado, com o conteúdo de actina, com marcadores inflamatórios, de remodelamento e do estresse oxidativo. Em relação às alterações de mecânica oscilatória do parênquima pulmonar distal, também houve forte correlação com todos os parâmetros avaliados exceto para eosinófilos com a resistência tecidual e de fibras colágenas, IL-13 e INOS com a elastância tecidual.

Consideramos que os dados acima sugerem que o tratamento com a associação do inibidor da Rho quinase ao corticosteróide possa representar uma nova alternativa terapêutica para a asma.

Adachi T , Vita R, Sannohe S, Stafford S, Alam R, Kayabe H, Chihara J. The functional role of Rho and Rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils. *J Immunol.* 2001;167:4609-4615.

Adcock IM, Brown CR, Kwon O, Barnes PJ. Oxidative stress NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199:1518-1524.

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.

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

Albertine KH, Wang L, Watanabe S, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Temporal correlation of measurements of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283:219-233.

Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amounts of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Resp J.* 1993; 6:1368-1370.

Amorim AJ, Daneluzzi JC. Prevalence of asthma in schoolchildren. *J Pediatr.* 2001;77:197-202.

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.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Linderman JH, Fereira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J*. 2008;32(1):61-9.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):12-24.

Bäiz N, Annesi-Maesano I. Is the asthma epidemic still ascending? *Clin Chest Med*. 2012;33:419-429.

Bardi G, 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. 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, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJO, Byrnes. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008;31:143-178.

Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(3):437-44.

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 Rad Biol Med*. 1999; 26:454-462.

Bijanzadeh M, Mahesh P, Ramachandra NB. An understanding of the genetic basis of asthma. *Ind J Med Res.* 2011;134:149-161.

Blackford JA, Antonini JMJ, Castanova V and Dey RD. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;11:426-431.

Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, Derwand R, de Wit C, Loirand G, Pohl U. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation.* 2003;107:3081-7.

Bousquet J, Bousquet PJ, Godard P, Daures JP. The public health implications of asthma. *Bull World Health Organ.* 2005;83(7):548-554.

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.

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Verge P, Ahlstedt D, Simony-La fontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323:1033-9.

Bradley AB, Morgan KG. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. *J Physiol.* 1986;383:437-48.

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

Bukstein D, Luskin AT, Brooks EA. Exhaled nitric oxide as a tool in managing and monitoring difficult-to-treat asthma. *Allergy Asthma Proc.* 2011;32:1-8.

Cabral AL, Conceição GM, Fonseca-Guedes CH, Martins MA. Exercise-induced bronchospasm in children: effects of asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1819-23.

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

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

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

Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet LP, Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL11, IL 17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:1293-1298.

Charokopos N, Apostolopoulos N, Kalapodi M, Leotsidis M, Karamanos N, Mouzaki A. Bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease and NF-kappaB. *Curr Med Chem*. 2009;16(7):867-83.

Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets kappa B-alpha to the ubiquitin-proteosome pathway. *Genes Dev*. 1999;9:1586-1597.

Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(1):85-93.

Chiba Y, Arima J, Sakai H, Misawa M. Lovastatin inhibits bronchial hyperresponsiveness by reducing RhoA signaling in rat allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:705-713.

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

Cho JY. Recent advances in mechanisms and treatments of airway remodeling in asthma: a message from the bench side to the clinic. *Korean J Intern Med*. 2011;26(4):367-83.

Culotta E, Koshland DE. NO news is good news. *Science*. 1992;258:1862-1865.

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.

DATASUS. Disponível em: www.datasus.gov.br.

Davies SP., Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000; 351:95-105.

de Magalhães Simões S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezilian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(5):602-11.

De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, de Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis*. 1985;131:373-376.

Del Maestro RF, Bjork J, Arfors K. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. I. In vivo study. *Microvasc Res.* 1981;22:239-254.

Del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andres B, Cardaba B, Lopez-Farre A, Gallardo S, Cortegano I, Vidarte L, Jurado A, Sastre J, Palomino P, Lahoz, C. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol.* 1997;158(2):859-64.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol.* 2012;38(1)S1-S46.

Doelman CJA, Bast A. Oxygen radicals in lung pathology. *Free Rad Biol Med.* 1990;9:381-400.

Dolhnikoff M, da Silva LF, de Araujo BB, Gomes HÁ, Fernezlian S, Mulder A, Lindeman JH, Mauad T. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(5):1090-7.

Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax.* 2000;55(Suppl2):S51-3.

Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscle underlying bronchial asthma. *Am Res Respir Dis.* 1993;148:720-6.

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.

Endou K, Iizuka K, Yoshii A, Tsukagoshi H, Ishizuka T, Dobashi K, Nakazawa T, Mori M. 8-Bromo-cAMP decreases the Ca²⁺ sensitivity of airway smooth muscle contraction through a mechanism distinct from inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287(4):L641-48.

Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest.* 2002;82:425-441.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002; 420:629-635.

Evans RL, Nials AT, Knoeles RG, Kidd EJ, Ford WR. A comparison of antiasthma drugs between acute and chronic ovalbumin-challenged guinea-pig models of asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2012;1-12.

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.

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.

Fu X, Gong MC, Jia T, Somlyo AV, Somlyo AP. The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS- and phorbol ester-induced Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett.* 1998;440:183-7.

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.

Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao X-Q, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-Oka S, Inoko H, HO LP, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Comm.* 2000;267:761-3.

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

Gilchrist M, Savoie M, Nohara O, Wills FL, Wallace JL, Befus AD. Nitric oxide synthase and nitric oxide production in in vivo-derived mast cells. *J. Leukoc. Biol*. 2002;71:618-624.

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

Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and Prevention Program*. 2011. National Heart, Lung and Blood Institute/ World Health Organization. Workshop Report. Washington, U.S. Department of Health, Education, and Welfare. 2011. Available from: <http://www.ginasthma.org>. Date last update, 2011. Publication No. 02-3659.

Goldsmith AM, Hershenov MB, Wolbert MP, Bentley JK. Regulation of airway smooth muscle alpha-actin expression by glucocorticoids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;292(1):L99-L106.

Goleva E, Hauk PJ, Boguniewicz J, Martin RJ, Leung DYM. Airway remodeling and lack of bronchodilator response in steroid resistance (SR) asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(5):1065-1072.

Gong MC, Iizuka K, Nixon G. Role of guanine nucleotide-binding proteins ras-family or trimeric proteins or both in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93:1340-5.

Gosens R, Schaafsma D, Grootte Bromhaar MM, Vrugt B, Zaagsma J, Meurs H, Nelemans SA. Growth factor-induced contraction of human bronchial smooth muscle is Rho-kinase-dependent. *Eur J Pharmacol*. 2004;494:73-6.

Goto K, Chiba Y, Sakai H, Misawa M. Mechanism of inhibitory effect of prednisolone on Rho A upregulation in human bronchial smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(4):710-3.

Grasemann H, Yandava CN, Drazen JM. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin Experim Allergy.* 1999;29:39-41.

Green TL. Examining the temporal relationships between childhood obesity and asthma. *Econ Hum Biol.* 2012

Griffith MJ, Liu S, Curzen NP, Messent M, Evans TW. In vivo treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1995;268:L509–L518.

Haddad EB, Liu SF, Salmon M, Robichaud A, Barnes PJ, Chung KF. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in Brown Norway rats exposed to ozone: effect of dexamethasone. *Eur J Pharmacol.* 1995; 293(3):287-90.

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

Hamid Q. Pathogenesis of small airways in asthma. *Respiration.* 2012;84:4-11.

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

Hamid Q, Tulik MK. New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Ann Thorac Med.* 2007;2(1):28-33.

Hamid QA. Peripheral inflammation is more important than central inflammation. *Respir Med.* 1997;91:11-12.

Han Z, Xu G, Zhou J, Xing H, Wang S, Wu M, Zhang Y, Lu Y, Ma D. Inhibition of motile and invasive properties of ovarian cancer cells by ASODN against Rho-associated protein kinase. *Cell Commun Adhes.* 2005;12(1-2):59-69.

Hancox RJ, Stevens DA, Adcock M, Barnes PJ, Taylor DR. Effects of inhaled beta agonist and corticosteroid treatment on nuclear transcription factors in bronchial mucosa in asthma. *Thorax.* 1999;54(6):488-92.

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;158:1585-92.

Hashimoto T, Nakano Y, Yamashita M, Fang Y, Ohata H, Momose K: Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol.* 2002;88:256-261.

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

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.

Hickman-Davis J, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR, Matalon S. Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:4953-4958.

Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, Seiki H,

Saida K, Takai Y. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*. 1992; 267:8719-72.

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

Hirst SJ, Lee TH. Airway smooth muscle as a target of glucocorticoid action in the treatment of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:S201-6.

Holgate ST. Asthma genetics: waiting to exhale. *Nat Genet*. 1997;15:227-229.

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.

Hoshino M, Takashashi M, Takai Y, Sim J. Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:356-63.

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*. 2002;53:503-14.

International study of asthma and allergies in childhood Steering Committee
Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISSAC). *Eur Respir J*. 1998;12:315-35.

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

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I. Pharmacological properties of Y-27632, specific Inhibitor of Rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000;57:976-83.

Israel E, Chinchilli VM, Ford JG, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ. Use of regular scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomized, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet*. 2004; 364(9444):1505-12.

Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:522–543.

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

Jang AS. Steroid response in refractory asthmatics. *Korean J Intern Med*. 2012; 27:143-148.

Jarman ER, Lamb JR. Chronic models of airway inflammation, mucus hypersecretion and remodeling. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2005;2(2):119-126.

Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):176-83.

Jiang J, George SC. TGF- β 2 reduces nitric oxide synthase mRNA through a ROCK-dependent pathway in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;301: L361-L367.

Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9–11 year old children. *BMJ*. 1995;310:1225-9.

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.

Kang BN, Jude JA, Panettieri RA Jr, Walseth TF, Kannan MS. Glucocorticoid regulation of CD38 expression in human airway smooth muscle cells: role of dual specificity phosphatase 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(1):L186-93.

Katsumata U, Miura M, Ichinose M, Kimura K, Takahashi T, Inoue H, Takishima T. Oxygen radicals produce airway constriction and hyperreponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:1158-1161.

Kawano Y, Noma T. Modulation of mite antigen-induced imune responses by lecithin-bound iodine in peripheral blood lymphocytes from patients with bronchial asthma. *Eur Respir J.* 1995;11:312-6.

Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi-PGF2alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:590-596.

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

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

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

Kharitonov AS, Yates DH, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increases nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343:133-135.

Khor YH, Teoh Ak, Lam SM, Mo DC, Weston S, Reid DW, Walters EH. Increased vascular permeability precedes cellular inflammation as asthma control deteriorates. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(11):1659-67.

Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273:245-8.

Kitazawa T, Masuo M, Somlyo AP. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:9307-10.

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

Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9:371-377.

Kondrikov D, Caldwell RB, Dong Z, Su Y. Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis. *J Pharmacol Exper Ther*. 2011;337:628-635.

Kraft M. The distal airways: are they important in asthma? *Eur Respir J*. 1999;4(6):1403-17.

Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(5):1505-10.

Kumar RK, Foster PS. Are mouse models of asthma appropriate for investigating the pathogenesis of airway hyper-responsiveness? *Frontiers in Physiology*. 2012;3:1-7.

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

Kume H. RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target in asthma. *Curr Med Chem*. 2008;15:2876-85.

Kurashima K, Hoshi T, Takayanagi N, Takaku Y, Kagiya N, Otha C. Airway dimensions and pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Respirology*. 2012;17(1):79-86.

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

Lai CKW, Beasley R, Crane J, Foliaki S, Shah J, Weiland S; International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Three Study Group. Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: Phase Three of the Interacional Stydy of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2009;64:476-83.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147:697-704.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. A comparative stydy of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a beta 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;90:32-42.

Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IFLC, 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.

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.

Lazarus SC, Chinchilli VM, Rollings NJ, Boushey HA, Cherniack R, Craig TJ, Deykin A, DiMango E, Fish JE, Ford JG, Israel E. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;(175):783-790.

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β (1). *J Exp Med.* 2001;194:809-21.

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.

Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:3-22.

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK α is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5313-5327.

Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:229-33.

Lin CC, Lin CY, Ma HY. Pulmonary function changes and increased Th-2 cytokine expression and nuclear factor kB activation in lung after sensitization and allergen challenge in brown Norway rats. *Immunol Lett*. 2000;73(1):57-64.

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

Louis R, Schleich F, Barnes PJ. Corticosteroids still at the frontline in asthma treatment? *Clin Chest Med*. 2012;33:531-541.

Ludwig MS, Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol*. 1994;77:2029-2035.

Mallol J, Crane J, von Mutius E, Odhiambo J, Keil U, Stewart A. The ISAAC Phase Three Study Group. The Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: a global synthesis. *Allergol Immunopatho (Madr)*. 2012.

Maneechotesuwan K, Yao K, Ito K, Jazrawi E, Usmani OS, Adcock IM, Barnes PJ. Supression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. *PloS Med*. 2009;6(5):e 1000076.

Marques RH, Reis FG, Starling CM, Cabido C, de Almeida-Reis R, Dohnnikoff M, Prado CM, Leick EA, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates physical stress-induced lung hyper-responsiveness and oxidative stress in animals with lung inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(3):158-70.

Martinez FD, Helms PJ. Types of asthma and wheezing. *Eur Respir J Suppl.* 1998;27:3s-8s.

Matthew A, Shmygol A, Wray S. Ca^{2+} entry, efflux and release in smooth muscle. *Biol Res.* 2004;37(4):617-24.

Matsumoto H, Moir LM, Oliver BG, Burgess JK, Roth M, Black JL, McParland BE. Comparison of gel contraction mediated by airway smooth muscle cells from patients with and without asthma. *Thorax.* 2007;62(10):848-54.

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.

Mauad T, Xavier ACG, Saldiva PHN, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:968-75.

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

McGown CM, Brown NJ, Hellewell PG, Brookes ZLS. ROCK induced inflammation of the microcirculation during endotoxemia mediated by nitric oxide synthase. *Microvasc Res.* 2011;81:281-288.

McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Therapeutic administration of budesonide ameliorates allergen-induced airway remodelling. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(3):388-96.

McParland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol.* 2003;95:426-434.

Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *TRENDS Pharmacol Sciences*. 2003;24(9):450-5.

Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer MA, Macic L, Molendijk N, Zaagsma J. Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol*. 2002;136(3):391-8.

Meyer-Schwesinger C, Dehde S, von Ruffer, Gatzemieier S, Klug P, Wenzel UO, Stahl RA, Thaiss F, Meyer TN. Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF-kappaB p65 signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(5):F1088-99.

Miller M, Cho JY, McElwain S, Shim JY, Manni M, Baek JS, Broide DH. Corticosteroids prevent myofibroblast accumulation and airway remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(1):L162-9.

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

Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson Roberts L, Morrow JD. Quantification of f2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol*. 2007; 433:113-26.

Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:8467-8477.

Ministério da Saúde [Internet]. Secretária Executiva. Datasus [acesso em outubro de 2012]. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e de morbidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.

Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:386-390.

Miotto D, Christodoulopoulos P, 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 chemotatic proteins 1, 3 and 4; and eotaxin in TH1-and TH2-mediated lung diseases *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(4):664-70.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginina: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:1709-15.

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

Montuschi, P. Pharmacotherapy of patients with mild persistent asthma: strategies and unresolved issues. *Frontiers in Pharmacology.* 2011;2:1-14.

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.

Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(2):148-53.

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.

Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic Inflammation and asthma. *Mutat Res*. 2010; 690(1-2):24-39.

Nakajima J, Ono M, Takeda M, Kawauchi M, Furuse A, Takizawa H. Role of costimulatory molecules on airway epithelial cells acting as all antigen presenting cells. *Transplant Proc*. 1997; 29:2297-2300.

Nakashima AS, Prado CM, Lanças 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.

National Institute of Health/World Health Organization. National Asthma Education and prevention program. Expert panel Report 2. *Guidelines for the diagnosis and management of asthma*. Washington, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1997.

Nossaman BD, Nossaman VE, Murthy SN, Kadowitz PJ. Role of the RhoA/Rho-kinase pathway in the regulation of pulmonary vasoconstrictor function. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2010;88:1-8.

Nunes KP, Rigsby CS, Webb RC. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? *Cell. Mol. Life Sci*. 2010;67(22):3823-36.

Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:177-181.

Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, Isoyama S, Tanno Y, Tamura G, Yamauchi K, Nagura H, Shirato K. Eosinophils as a source of

matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:212-9.

Pauwels R. The relationship between airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy.* 1989;19:395-8.

Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax.* 1999;54:268-72.

Pechkovsky DV, Hackett TL, An SS, Shaheen F, Murray LA, Knight DA. Human lung parenchyma but not proximal bronchi produces fibroblasts with enhanced TGF-beta signaling and alpha-SMA expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43:641-651.

Pechkovsky DV, Zissel G, Stamme C, Goldmann T, Ari Jaffe H, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 2002;19:672-683.

Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand.* 1990;140(4):449-57.

Pfeiffer ZA, Aga M, Prabhu U, Watters JJ, Hall DJ, Bertics PJ. The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J Leukoc Biol.* 2004;75(6):1173-82.

Platts-Mills TA, Wheatley LM. The role of allergy and atopy in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 1996;2(1):29-34.

Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, Perini A, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério I de F. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012; 303(11):L939-52.

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*. 2011a;37:259-268.

Prado CM, da Rocha GZ, Leick-Maldonado EA, Starling CM, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Inactivation of capsaicin-sensitive nerves reduces pulmonary remodeling in guinea pigs with chronic allergic pulmonary inflammation. *Braz J Med Biol Res*. 2011b;44(2):130-9.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35:457-465.

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, 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.

Prasain N, Stevens Troy. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular Research*. 2009;77:53-63.

Prosser FH , Wahl LM. Involvement of the Ornithine Decarboxylase Pathway in Macrophage Collagenase Production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1988;260:218-225.

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.

Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang Y-CT. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am PJ Physiol*. 1998; 275(19):L96-L102.

Rakes GP, Arruda E, Ingram JM. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care: IgE and eosinophil analysis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:785-90.

Reddel H, Ware S, Marks G. Differences between asthma exacerbations and poor asthma control. *Lancet*. 1999;353:364-9.

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

Rhoden KJ, Barnes PJ. Effect of hydrogen peroxide on guineapig tracheal muscle in vitro: role of cyclooxygenase and airway epithelium. *Br J Pharmacol*. 1989;98:325–330.

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

Ricciardolo FL. cNos-iNOS paradigm and arginase in asthma. *Trends Pharmacol Sci*. 2003a;58:175-182.

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

Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *TRENDS in Cell Biology*. 2001;11(12):471-477.

Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, and Polak JM. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:209-218.

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.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1:520-524.

Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC, Bishop AE. iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol*. 2002;197:372-379.

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.

Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, do Patrocínio M, Warth TN, Zin WA, Saldiva PH, Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. *Am J Physiol.* 1994;266:L23-L29.

Santing RE, Olymulder CG, Zaagsma J, Meurs H. Relationships among allergen-induced early and late phase airway obstructions, bronchial hyperreactivity, and inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;93(6):1021-30.

Santos LA, Oliveira Ma, Faresin SM, Santoro IL, Fernandes ALG. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Brazilian Journal of medical and Biological Research.* 2007;40:943-948.

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

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.

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, 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.

Schuling M, Meurs H, Zuidhof AB, Venema N, Zaagsma J. Dual action of iNOS-derived nitric oxide in allergy-induced airway hyperreactivity in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1442-9.

Seco AJ, Salgueiro MA, Villanueva MA, Manso G. Treatment with high doses of terbutaline induces β -adrenergic desensitization of guinea pig trachea not prevented by addition of dexamethasone. *Respiration*. 2000;67:559-564.

Seow CY. Passive stiffness of airway smooth muscle: The next target for improving airway distensibility and treatment for asthma? *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2012;1-5.

Sheppard MN, Harrison NK. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 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, Kamiya K. 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.

Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F. Antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics*. 1995;95:500-5.

Souza FC, Gobbato NB, Maciel RG, Prado CM, Martins MA, Leick EA, Tibério IF. Effects of corticosteroid, montelukast and iNOS inhibition on distal lung with chronic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013;185(2):435-45.

Spoelstra FM, Postma DS, Kauffman HF. Mutual activation of pulmonary fibroblasts and eosinophils, and modulation by drugs in relation to asthma. *Clin Experim Allergy*. 2001;31:808-16.

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.

Stenius-Aarniala B, Poussa T, Kvarnström J, Grönlund EL, Ylikahri M, Mustajoki P. Immediate and long term effects of weight reduction in obese people with asthma: randomized controlled study. *BMJ*. 2000;25;320(7238):827-32.

Sugiura H, Ichinose M. Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric Oxide*. 2011;1:25(2):138-44.

Sullivan PW, Ghushchyan VH, Sleiko JF, Belozeroff V, Globe DR, Lin SL. The burden of adult asthma in the United States: evidence from the Medical Expenditure Panel Survey. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):363-369.

Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2007;56(4):331-40.

Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106:57-62.

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.

Talati M, Meyrick B, Peebles RS Jr, Davies SS, Dworski R, Mernaugh R, Mitchell D, Boothby M, Roberts LJ 2nd, Sheller JR. Oxidant stress modulates murine allergic airway responses. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(7):1210-9.

Tate RM, van Benthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF, Repine JE. Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am rev Respir Dis*. 1982;126:802-806.

Tattersfield AE, Hall IP. Are beta2-adrenoceptor polymorphisms important in asthma-an unraveling story. *Lancet*. 2004;364(9444):1464-6.

Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem*. 1989;264:654-8.

ten Hacken NH, Oosterhoff Y, Kauffman HF, Guevara L, Satoh T, Tollerud DJ, Postma DS. 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.

Tibério IFLC, Leick-Maldonado EA, Miyara L, Kasahra DI, Spilborghs GMGT, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinins on airway and alveolar eosinophil recruitment. *Exp Lung Res*. 2003;29:167-77.

Tibério IFLC, 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.

Thomae KR, Geller DA, Billiar TR, Davies P, Pitt BR, Simmons RL, Nakayama DK. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase muscle cells in culture. *Surgery*. 1993;114:272-277.

Tiddens H, Silverman M, Bush A. The role of inflammation in airway disease remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:S7-S10.

Tomlinson JE, McMahon AD, Chaudhuri R, Thompson JM, Wood SF, Thomson NC. Efficacy of low and high dose inhaled corticosteroid in smokers versus non-smokers with mild asthma. *Thorax*. 2005;60(4):282-7.

Tripathi P, 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. *Chest*. 2003;123:348-355.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389:990-4.

Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998;280:243-8.

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

Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medications in the European Community Respiratory Healthy Survey (ECRHS). *European Respiratory Journal*. 1996;9:687-695.

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

Vignola AM, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Scichilone N, Spatafora M, Bousquet J, Bonsignore G, Bellia V. Effect of age and asthma duration upon elastase and alpha1-antitrypsin levels in adult asthmatics. *Eur Respir J*. 2003b;22(5):795-801.

Vignola AM, Gagliardo R, Siena A, Chiappara G, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G. Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1(2):108-15.

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

Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, Bellia V, Bousquet J, Bonsignore G. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(2):505-11

Wadsworth SJ, Sin DD, Dorscheid DR. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. *Journal of Asthma and Allergy*. 2011;4:77-86.

Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, Liu MCI. Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:447-452.

Wagner EM, Liu MC, Weinmann GG, Bleecker ER. Peripheral lung resistance in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:584-588.

Warner RL, Paine R, Christensen PJ, Marletta MA, Richards MK, Wilconsen SE and Ward PA. Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12:649-661.

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

Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ, Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:629-639.

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

Weiss EB, Bellino JR. Leukotriene-associated toxic oxygen metabolites induces airway hyperreactivity. *Chest.* 1986;89:709-716.

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

Wiesch Dg, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(5):895-901.

Witzenrath M, Ahrens B, Kube SM, Hocke AC, Rosseau S, Hamelmann E, Suttorp N, Schütte H. Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur Respir J.* 2006;28:370-377.

Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J.* 2003;21(1):177-86.

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.

World Health Organization 2007. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Available from: <http://www.who.int>

Wright RJ, Subramanian SV. Advancing a multilevel framework for epidemiologic research on asthma disparities. *Chest*. 2007;132(5):757S-769S.

Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: oxide nitric and beyond. *Biochem J*. 1998;336:1-17.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan S, Foster PS, Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol*. 1999;162:445-452.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:829-837.

Yamagata S, Ichinose M, Sugiura H, Koarai A, Koike K, Shirato K. Effect of a calcium sensitization modulator, Y-27632, on isolated human bronchus and pulmonary artery. *Pulm Pharmacol Ther*. 2000;13:25-29.

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

Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T, Mori M. 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.

Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):253-62.

Zhou H, Zhang KX, Li YJ, Guo BY, Wang M, Wang M. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38:387-394.

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