THAYSE REGINA BRÜGGEMANN

**Análise do perfil inflamatório e de células dendríticas
na imunomodulação induzida pela fumaça do cigarro
em um modelo murino de inflamação pulmonar
alérgica crônica**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brüggemann, Thayse Regina

Análise do perfil inflamatório e de células dendríticas na imunomodulação induzida pela fumaça do cigarro em um modelo murino de inflamação pulmonar alérgica crônica / Thayse Regina Brüggemann -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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

Orientador: Milton de Arruda Martins.

*Dedico esta tese à minha família,
em especial aos meus pais e meu marido*

Que vai ser quando crescer?
Vivem perguntando em redor. Que é ser?
É ter um corpo, um jeito, um nome?
Tenho os três. E sou?
Tenho de mudar quando crescer? Usar outro nome, corpo e jeito?
Ou a gente só principia a ser quando cresce?
É terrível, ser? Dói? É bom? É triste?
Ser; pronunciado tão depressa, e cabe tantas coisas?
Repito: Ser, Ser, Ser. Er. R.
Que vou ser quando crescer?
Sou obrigado a? Posso escolher?
Não dá para entender. Não vou ser.
Vou crescer assim mesmo.
Sem ser Esquecer.

(Carlos Drummond de Andrade)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por me guiar por onde só há família, amigos e luz. Por ter me dado o mundo de presente e me permitir contemplá-lo.

Tenho tanta gente pra agradecer. Cada dia importa, cada passo, cada pequena conquista que nos faz ser quem nos tornamos.

Agradeço...

Aos meus pais, por serem tudo! Por muitas vezes, mesmo desacreditados da minha escolha, sempre me apoiaram. Por serem exemplo de dignidade, luta e muito amor. A minha avó Celestina, minha “mota”, por rezar por mim, acreditar e por sempre me esperar com o sorriso mais lindo que pode existir! Aos meus irmãos, que nunca acreditaram mesmo (risos), mas estavam lá pra me “zoar” e fazer com que eu tivesse mais força pra seguir. Evandro e Cris, que deram vida ao que temos de mais valioso nas nossas vidas, minhas meninas Maria Luiza e Eduarda, razões pelas quais vale a pena sempre ser melhor. Tati, por ter aberto a porta quando me mudei pra São Paulo e ter me acompanhado por todo caminho e pelas infinitas risadas juntas.

Ao meu namorado, noivo e marido Roberto, que me apoiou e acreditou em todos os momentos, por ter paciência, por ir trabalhar comigo nos finais de semana, por ter dito a coisa certa na hora certa: “vou contigo”. Eu não precisava de mais nada. Te amo!

Aos meus amigos, tios e primos de Rancho Queimado e Florianópolis, que mesmo estando longe, estavam lá pra uma conversa descontraída e divertida.

Aos amigos feitos em São Paulo: grupo LIM20. Por onde começar...

Professor Milton, obrigada pela oportunidade de fazer parte do LIM20, fazer parte do seu laboratório foi sempre motivo de alegria e orgulho. Obrigada por estar sempre aberto para conversar e pela paciência. Obrigada por ter orientado e ter tornado essa tese possível.

Professora Lúcia, obrigada por ter tornado possível minha matrícula e ter permitido que eu ajudasse nas aulas de seu curso. Obrigada por seu exemplo de dignidade, responsabilidade e gentileza.

Fê! Mãezona, melhor abraço todas as manhãs, chorona, engraçada, prática, objetiva, batalhadora, professora, infinitas qualidades e o melhor, minha orientadora! Do dia em que nos vimos na sala do chefe ao dia de hoje, muito obrigada! Obrigada mesmo! Essa tese foi um presente. As dificuldades ficaram pequenas em meio a tantos momentos bons ao seu lado. Obrigada por ter sempre deixado a caminhada mais leve pra mim, por ter apoiado na hora do aperto, por ter comprado umas ideias doidas, por ter me ensinado tanto. Serei eternamente grata por ter tido você como orientadora. Você é “o cara”!

Paula, companheira de cela (risos) e parceira, obrigada pela ajuda e pelas risadas. Clarice, amiga linda, obrigada por ser alto astral, positiva, coração generoso, pelas conversas dentro e fora do laboratório. Rô, obrigada pela ajuda sempre. Eficiência no nome, sempre fez com que minha vida fosse mais fácil. Obrigada pelas conversas e desculpa por não te deixar trabalhar às vezes. Edna,

obrigada por me receber sempre com um sorriso doce e palavras de carinho. Davi, obrigada por ter me ajudado tantas vezes com os animais, mas principalmente por ser exemplo de humildade, educação e gentileza. Obrigada aos professores Bia, Fe Lopes, Rodolfo, Celso, Iolanda, Carla, Adenir e Paulo Saldiva por serem inspiração para quem tem a oportunidade de conhecê-los e quem se forma no LIM20. Obrigada Fran, Isa, Soraia, Fê Roncon, Natália, Dani, Ju, Tiyaqi, Davi, Fabí, Sara e demais colegas que passaram e que estavam no laboratório enquanto eu estava lá. Obrigada por terem dividido experiências!

Obrigada ao professor Bruce, que foi orientador durante a fase de estágio na Universidade de Harvard, por ter dado a oportunidade e ensinar tanto como pessoa e profissional. Obrigada por abrir mais uma vez as portas, agora para o pós-doutorado. Obrigada aos colegas e amigos do Levy Lab, Nandini, Raja, Melody, Kate, Braden, Alex e Guangli por serem amigos e família longe do Brasil. Aos amigos do laboratório da Dra. Caroline, Josi, Heider, Ilias and Xiao pelos almoços divertidos.

Agradeço a CAPES e a FAPESP (Projeto Regular 2014/21395-6, Bolsa DD 2014/12398-1, Bolsa BEPE 2015/26048-5) por terem facilitado financeiramente e tornado possível esta tese.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este dia chegasse com alegria como está sendo.

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta tese 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. Divisão 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: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	
	Lista de Tabelas	
	Lista de Abreviaturas	
	Resumo	
	Summary	
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Asma	1
1.1.1	Definição, diagnóstico e tratamento da asma	3
1.1.2	Epidemiologia da asma	5
1.1.3	Fisiopatologia da asma	5
1.1.3.1	Hiperresponsividade e remodelamento brônquico na asma	6
1.1.3.2	Resposta imunológica na asma alérgica	6
1.1.4	Efeitos pulmonares do tabagismo na asma	12
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos gerais	16
2.2	Objetivos específicos	16
3.	HIPÓTESE DE TRABALHO	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Animais	19
4.2	Grupos Experimentais	20
4.3	Sensibilização e indução da inflamação pulmonar alérgica	20
4.4	Exposição à fumaça de cigarro	21
4.5	Avaliação dos níveis de cotinina e carboxihemoglobina	23
4.6	Avaliação da mecânica pulmonar	24
4.7	Obtenção do plasma sanguíneo	25
4.8	Análise histológica do pulmão	25
4.9	Dosagem de IgE OVA-específica	26

4.10	Dosagem de citocinas	27
4.11	Análise do perfil inflamatório por citometria de fluxo	28
4.12	Diferenciação de células dendríticas derivadas da medula óssea (Bone Marrow Dendritic Cell - BMDC)	31
4.13	Preparação do extrato da fumaça de cigarro e estimulação das células	32
4.14	Análise do efeito da OVA e/ou do extrato de fumaça de cigarro sobre as BMDCs por citometria de fluxo	33
4.15	Análise do efeito da OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro sobre a capacidade inflamatória das BMDCs	35
4.16	Análise estatística	36
5.	RESULTADOS	37
5.1	Níveis de cotinina e carboxihemoglobina	37
5.2	Responsividade brônquica	39
5.3	Remodelamento pulmonar	42
5.4	Imunoglobulina antígeno-específica séricos e citocinas no pulmão	44
5.5	Granulócitos e macrófagos no lavado broncoalveolar e pulmão	48
5.6	Linfócitos no pulmão	53
5.7	Células dendríticas no pulmão e nos linfonodos mediastinais	58
5.8	Maturação, ativação, capacidade migratória e fagocítica das BMDCs	63
5.9	Expressão gênica de IL-13 e Muc5ac em BMDCs	68
6.	DISCUSSÃO	70
7.	CONCLUSÕES	78
8.	ANEXOS	79
9.	REFERÊNCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sensibilização das vias aéreas na indução de asma alérgica

Figura 2 – Protocolo experimental

Figura 3 – Esquema da exposição à fumaça de cigarro

Figura 4 – A exposição à fumaça de cigarro eleva a cotinina a níveis de humanos fumantes crônicos

Figura 5 – A exposição à fumaça de cigarro eleva o nível de carboxihemoglobina (COHb) sérica de forma semelhante a humano fumante

Figura 6 – A exposição a fumaça de cigarro não altera a reatividade pulmonar distal

Figura 7 – A exposição à fumaça de cigarro não altera a reatividade pulmonar proximal induzida pela OVA

Figura 8 – O fumo por si só induziu a deposição de fibras colágenas embora a co-exposição não apresente potencialização deste efeito

Figura 9 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz o remodelamento epitelial brônquico

Figura 10 – A co-exposição à fumaça de cigarro também reduz a produção epitelial de muco

Figura 11 – A co-exposição à fumaça de cigarro manteve elevada a produção sérica de IgE OVA-específica no plasma induzida pela sensibilização antigênica

Figura 12 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduziu a produção de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar induzida pela sensibilização antigênica

Figura 13 – A co-exposição ao fumo reduz os elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias induzidos pela OVA enquanto que exposição ao fumo por si só eleva a produção de TGF- β

Figura 14 – A co-exposição ao fumo reduz o influxo de eosinófilos na luz das vias aéreas de animais sensibilizados

Figura 15 – De forma independente, fumo e sensibilização antigênica elevam o influxo de macrófagos do tipo 1 (M1) à luz das vias aéreas

Figura 16 – A exposição à fumaça de cigarro induz maior influxo de macrófagos do tipo 2 (M2) na luz das vias aéreas independentemente da sensibilização antigênica

Figura 17 – A co-exposição ao fumo eleva o número de neutrófilos no homogenato pulmonar

Figura 18 – A co-exposição ao fumo exacerba o influxo pulmonar de linfócitos T CD4⁺ induzido pela inflamação alérgica

Figura 19 – A co-exposição ao fumo amplifica o já elevado influxo pulmonar de linfócitos T CD8⁺

Figura 20 – A co-exposição à fumaça de cigarros também eleva a ativação celular destes linfócitos T CD8⁺ pulmonares

Figura 21 – A co-exposição à fumaça de cigarros reduz o influxo pulmonar de células Treg nos animais sensibilizados à OVA

Figura 22 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz o influxo pulmonar de célula dendrítica CD11b⁺

Figura 23 – A co-exposição ao fumo reduz o número de células dendríticas plasmocitoides (pDCs) no pulmão

Figura 24 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz a ativação das pDCs amplificando o perfil pró-inflamatório

Figura 25 – A co-exposição à fumaça de cigarro elevou significativamente o número de CD8 α ⁺ DC nos linfonodos mediastinais

Figura 26 – A viabilidade das BMDCs não foi afetada pela exposição ao extrato de fumaça de cigarro

Figura 27 – A expressão CD11c em BMDC não se alterou com pulso com OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro

Figura 28 – A exposição ao extrato de fumaça de cigarros reduz levemente a elevação da expressão de MHC II em BMDC pulsada com OVA

Figura 29 – A exposição ao extrato de fumaça de cigarros eleva a capacidade migratória das BMDCs pulsadas com OVA

Figura 30 – A exposição ao extrato de fumaça de cigarros eleva a capacidade fagocítica de BMDCs

Figura 31 – Fotos ilustrativas de BMDCs no aumento de 400 x

Figura 32 – BMDCs pulsada com OVA e expostas ao extrato da fumaça de cigarro apresentam reduzida a expressão de IL-13

Figura 33 – O extrato da fumaça de cigarro não altera a expressão gênica de Muc5ac em BMDC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos grupos experimentais

Tabela 2 – Tabela de anticorpos de acordo com os compartimentos

Tabela 3 – Tabela de anticorpos de acordo com a diferenciação celular

Tabela 4 – Tabela de anticorpos de acordo com a análise de maturação, ativação, capacidade migratória e fagocítica das BMDCs

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula apresentadora de antígeno (do inglês, *antigen presenting cell*)

BMDC – Célula dendrítica derivada da medula óssea (do inglês, *bone marrow dendritic cell*)

CCR7 – Receptor de quimiocinas do tipo CC7 (do inglês, *C-C chemokine receptor type 7*)

CD – Grupo de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*)

cDC – Célula dendrítica convencional (do inglês, *common dendritic cell*)

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês, *complimentary deoxyribonucleic acid*)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CVF – Capacidade Vital Forçada

DC – Célula dendrítica (do inglês, *dendritic cell*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

DO – Densidade ótica

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Ers – Elastância do sistema respiratório

F – grupo experimental que não foi sensibilizado mas foi exposto à fumaça de cigarro

FACS – Separação de células por ativação de fluorescência (do inglês, *fluorescence-activated cell sorting*)

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FSC-A - Dispersão do laser para frente (do inglês, *forward scatter – area*)

GM-CSF – Fator de estimulação de colônia de granulócito e macrófago (do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

IgE – Imunoglobulina do tipo E

IL – Interleucina

ILC2 – Células linfoides inatas do grupo 2 (do inglês, *group 2 innate lymphoid cells*)

LBA – Lavado broncoalveolar

LIM20 – Laboratório de Terapêutica Experimental 20

M1 – Macrófago do tipo 1 (macrófago inflamatório)

M2 – Macrófago do tipo 2 (macrófago alveolar)

MHC I – Complexo de histocompatibilidade classe I (do inglês, *major histocompatibility complex class I*)

MHC II – Complexo de histocompatibilidade classe II (do inglês, *major histocompatibility complex class II*)

MMP - Metaloproteinase (MMP, do inglês *Matrix Metalloproteinase*)

NIH – Instituto Nacional de Saúde (do inglês, *National Institute of Health*)

OF – Grupo experimental que foi sensibilizado e desafiado com o antígeno e exposto à fumaça de cigarro

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVA – Ovalbumina ou grupo experimental que foi sensibilizado e desafiado com o antígeno ovalbumina

PAS-AB – Coloração ácido *periódico-Schiff* azul (do inglês, *periodic acid Schiff - alcian blue*)

PBS – Tampão fosfato (do inglês, *phosphate buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*).

pDC – Célula dendrítica plasmocitoide

PS – Coloração picrosírius

qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês, *quantitative real time-polymerase chain reaction*)

RNA – Ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*)

Rrs – Resistência do sistema respiratório

SAL – Grupo experimental que não foi sensibilizado com antígeno ou exposto à fumaça de cigarro

SPF – Livre de patógenos específicos (do inglês, *specific pathogen free*)

T CD4⁺ – Linfócito T CD4⁺

T CD8⁺ – Linfócito T CD8⁺

TGF- β – Fator de transformação de crescimento (do inglês, *transforming growth factor- β*)

Th – Linfócito T auxiliar (do inglês, *T helper*)

TMB – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

Treg – Linfócito T regulador ou célula T regulatória

VEF₁ – Volume expiratório forçado no primeiro segundo

RESUMO

A asma afeta aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo e é a maior causa de internação hospitalar em crianças nos países desenvolvidos. Essa doença é incurável e por vezes refratária ao tratamento em um número significativo de pacientes. As taxas de prevalência de tabagismo entre pacientes asmáticos são semelhantes aos da população em geral e o impacto da fumaça de cigarro nestes pacientes ainda é clinicamente controverso. O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil inflamatório e analisar o papel das células dendríticas sobre a imunomodulação provocada pela exposição à fumaça do cigarro na inflamação alérgica pulmonar induzida previamente por ovalbumina (OVA) em um modelo murino. Primeiramente avaliamos *in vivo* a ação da fumaça de cigarro na inflamação pulmonar alérgica crônica avaliando a responsividade brônquica, o remodelamento pulmonar, a produção de anticorpos antígeno-específicos, o perfil de células inflamatórias pulmonares e sistêmicas e a produção de citocinas inflamatórias e moduladoras. Em seguida, realizamos estudo *in vitro* do perfil de maturação, migração e inflamatório de células dendríticas expostas a OVA e/ou a extrato de fumaça de cigarro. Nosso estudo mostrou que a sensibilização e desafios inalatórios com OVA levaram à inflamação pulmonar de característica Th2 com aumento de responsividade brônquica, remodelamento, altos níveis de IgE e de citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13. A exposição à fumaça de cigarro, surpreendentemente, levou a uma redução dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, e simultaneamente reduziu os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β em animais sensibilizados e desafiados com antígeno. Foi observada nestes animais, uma redução no número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e aumento no número de neutrófilos no pulmão. A combinação da inflamação alérgica com exposição à fumaça de cigarro levou a um aumento do recrutamento

e ativação de células dendríticas linfoides nos linfonodos mediastinais, que mostrou relação direta com aumento do influxo de células T CD8⁺ e ativação das mesmas no pulmão. A inflamação alérgica juntamente com a exposição à fumaça de cigarro, levou a uma redução no recrutamento de células dendríticas plasmocitoides além de reduzir o recrutamento de células T regulatórias. *In vitro*, mostramos que o extrato de fumaça de cigarro combinado ao antígeno aumenta a capacidade migratória e fagocítica do antígeno pelas BMDCs. No entanto, houve redução da expressão gênica para IL-13 neste mesmo grupo. Concluímos que neste modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica combinada com a exposição à fumaça de cigarro leva a uma descaracterização do perfil inflamatório característico da resposta Th2 com a redução do recrutamento de eosinófilos, redução dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 aliados a um aumento do número de neutrófilos, o que pode estar relacionado ao aumento do recrutamento e ativação de células dendríticas linfoides bem como de células T CD8⁺ e redução local de células dendríticas plasmocitoides. Mostramos ainda que a fumaça de cigarro juntamente com o antígeno leva as células dendríticas a aumentarem sua capacidade fagocítica porém, reduzir sua capacidade pró-inflamatória pela expressão gênica reduzida de IL-13.

Descritores: Asma, alergia e imunologia, inflamação, hábito de fumar, células dendríticas, linfócitos T.

ABSTRACT

Asthma affects approximately 300 million people worldwide and it is the major cause of hospitalization among children in developed countries. This disease is often refractory to treatment in a high number of patients. The prevalence rates of smoking among asthmatic patients are similar to the general population and the impact of cigarette smoke is also clinically controversial. The main goal of this study is to outline, in a murine model, the inflammatory profile and to analyze the role of dendritic cells on the immunomodulation caused by exposure to cigarette smoke in ovalbumin (OVA)-induced pulmonary allergic inflammation. First, we evaluated *in vivo* the action of cigarette smoke on chronic allergic pulmonary inflammation, evaluating the bronchial responsiveness, pulmonary remodeling, the production of antigen-specific antibodies, pulmonary and systemic inflammatory cell profile and the production of inflammatory and modulating cytokines. Next, we performed an *in vitro* study of the maturation, migration and inflammatory profile of dendritic cells exposed to OVA and/or cigarette smoke extract. Our study showed that sensitization and challenge with OVA led to Th2-type lung inflammation with increased bronchial responsiveness, remodeling, high levels of IgE and pro-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13. Exposure to cigarette smoke has surprisingly led to a reduction in levels of IL-4, IL-5 and IL-13, and simultaneously reduced levels of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β in animals sensitized and challenged with the antigen. We also observed a reduction in the number of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid and an

increase in the number of neutrophils in the lung of these animals. The combination of allergic inflammation with exposure to cigarette smoke led to increased recruitment and activation of lymphoid dendritic cells in the mediastinal lymph nodes, which showed to be directly related with increased activation and influx of CD8⁺ T cells in lung. Allergic inflammation combined with cigarette smoke led to a decrease of plasmacytoid dendritic cells as well as regulatory T cells. *In vitro*, we showed that cigarette smoke extract combined with antigen increased migratory and phagocytic capacity of BMDCs. However, there was a reduction of IL-13 gene expression in this same group. We conclude that in this model of chronic pulmonary allergic inflammation combined with exposure to cigarette smoke leads to a mischaracterization of the characteristic inflammatory profile of the Th2 response with the reduction of eosinophil recruitment, reduction of levels of IL-4, IL-5 and IL-13 allied to increased number of neutrophils, which is related to increased recruitment and activation of lymphoid dendritic cells as well as CD8⁺ T cells and local decrement of plasmacytoid dendritic cells. We further show that cigarette smoke combined with antigen increases dendritic cell phagocytic capacity however, reduces its pro-inflammatory capacity by the reduced gene expression of IL-13.

Descriptors: Asthma, allergy and immunology, inflammation, smoking, dendritic cells, T lymphocytes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASMA

1.1.1 Definição, diagnóstico e tratamento da asma

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, acompanhada de um histórico de sintomas como sibilos, respiração curta, aperto torácico e tosse que variam de tempo e intensidade e variável limitação de fluxo aéreo expiratório [1].

Define-se asma como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, na qual diversas células e seus elementos participam do processo, em particular eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos [2]. Pode também ser observada em alguns pacientes a produção de secreção, particularmente seguida de exacerbações em sua forma crônica e persistente [1, 2].

Há diversos fatores genéticos e ambientais relacionados à obstrução das vias aéreas, que estão associados à existência de hipersensibilidade e/ou hiper-reatividade a uma variedade de estímulos desencadeada principalmente por exposição alérgica a antígenos provenientes de diversas fontes [2]. A atopia, que é a predisposição genética para o desenvolvimento de uma resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) à aeroalérgenos comuns é o mais forte indício de fator predisponente para o desenvolvimento da asma [2].

Entre os fatores ambientais destacam-se aqueles relacionados às baratas, ácaros, pelos de animais domésticos, pólen e a compostos químicos irritantes como perfumes, solventes orgânicos, pesticidas e metais, inalação de poluentes atmosféricos e fumaça de cigarro. Entretanto, outros fatores como a exposição ao ar frio e/ou seco, o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (por exemplo, o ácido acetilsalicílico), o exercício físico e fatores emocionais também podem desencadear ou agravar uma crise de sintomas de asma [2, 3].

O diagnóstico e acompanhamento funcional dos pacientes asmáticos são dados através de histórico dos sintomas relatados acima, além do teste de espirometria que verifica os volumes e capacidades pulmonares. Para isto analisa-se o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e sua relação com a capacidade vital forçada (CVF) [1, 4, 5].

O nível de gravidade da doença é definido a partir do histórico de meses ou anos, do tipo de tratamento e controle das exacerbações. A asma é dividida em três níveis de severidade: asma leve, que indica que o controle da doença é feito somente com baixas doses de corticosteroides inalados; asma moderada, em que o tratamento deve ser feito com baixas doses de corticosteroides inalados e β_2 -agonista de longa duração; e ainda a asma grave que se apresenta de difícil controle com persistência dos sintomas, ainda que o tratamento seja feito com corticosteroides inalados e β_2 -agonista de longa duração em altas doses [2].

O tratamento da asma é feito através da educação do paciente sobre a doença e a importância da adesão ao tratamento, identificação e controle dos

fatores de risco, medicação e prevenção das exacerbações. Os medicamentos mais utilizados no controle da asma são os β_2 -agonistas, corticoides e os antileucotrienos [6]. Estes medicamentos são indicados conforme o objetivo da sua utilização antes, durante ou após a exacerbação [4]. O exercício físico aeróbico pode se constituir em um complemento importante no tratamento da doença e vem sendo implementado na rotina de pacientes asmáticos fora do período de exacerbação, pois resulta no aumento das capacidades respiratória e ventilatória, além de propiciar atenuação da sintomatologia do quadro asmático [7-10].

1.1.2 Epidemiologia na asma

O número de casos de asma tem aumentado de modo indiscriminado pelo mundo, especialmente entre as crianças e em cidades com alto desenvolvimento socioeconômico. Esta relação ainda é controversa, mas sugere-se que em cidades mais desenvolvidas o número de habitantes que vive em apartamentos é maior, e por conta de geralmente serem áreas pouco ventiladas, propiciando então maior contato com alérgenos. Ainda há uma hipótese em que a tendência ao aumento da higiene evite a exposição precoce à microrganismos na infância, o que aumentaria o risco de desenvolver uma doença alérgica no futuro [11]. Além disto, deve-se levar em consideração a má qualidade do ar nestes grandes

centros decorrente da grande emissão de poluentes provenientes de automóveis e indústrias [12, 13].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que a asma é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade e que não é apenas um problema para os países de alta renda. Mais de 80% das mortes por asma ocorre em países de renda baixa e médio-baixa [14].

Estima-se que em um país desenvolvido como os Estados Unidos (EUA) exista aproximadamente 25,7 milhões de asmáticos. Outro fator que pode ser relevante com a relação entre o nível socioeconômico e os altos índices da doença pode ser a melhor condição de realizar o diagnóstico nos países desenvolvidos em relação aos locais em desenvolvimento. Aliado a isto, o menor índice de mortalidade nos países desenvolvidos deve-se aos maiores investimentos no controle e tratamento da doença [15].

No Brasil, no período que compreende janeiro de 2016 a janeiro de 2017, foram registrados aproximadamente 100 mil internações, 589 óbitos e um gasto aproximado de 55 milhões de reais com o manejo da asma. Sendo que somente no município de São Paulo a asma foi responsável por 4 mil internações, 34 óbitos e um valor gasto de aproximadamente 3 milhões de reais [16].

A asma é alvo de muito estudo e preocupação, relativos não somente aos altos encargos financeiros que impõe, mas também devido à perda de produtividade e redução nas atividades da vida diária e familiar.

1.1.3 Fisiopatologia da asma

1.1.3.1 Hiperresponsividade e remodelamento brônquico na asma

Até o presente momento, a maioria das informações sobre a patologia da asma tem sido obtida através da análise do tecido pulmonar post-mortem [1].

Pulmões de pacientes que faleceram devido à asma apresentam em suas vias aéreas de pequeno e grande calibre placas de substância formada de muco, proteínas séricas, células inflamatórias e debris celulares [17]. Em estudo conduzido com biópsia de 16 pacientes asmáticos, observou-se a presença maciça de eosinófilos e linfócitos T, em vias aéreas com diâmetro menor ou igual a 2 mm, comparadas às vias aéreas centrais do mesmo paciente [18]. Esses dados sugerem que a gravidade da asma pode ser dependente da localização do processo inflamatório eosinofílico, corroborando com a teoria na qual as pequenas vias aéreas também são as responsáveis pela obstrução na asma [19].

A hiperresponsividade em indivíduos asmáticos é caracterizada por um aumento dos valores de elastância e resistência do sistema respiratório [20]. A insuflação pulmonar é equivalente à distensão do pulmão em oposição às forças elásticas, que se altera com a rigidez aumentada do pulmão após o processo inflamatório instalado na doença [21]. Em pacientes asmáticos, a obstrução ao fluxo aéreo causado pelo estreitamento abrupto das vias aéreas impede a entrada

e saída de ar nos pulmões, aumentando então a resistência do sistema respiratório [2].

A frequente liberação de mediadores inflamatórios, principalmente histamina no momento em que há o contato com o alérgeno, pode levar à formação de edema perivascular e peribrônquico, recrutamento de células inflamatórias, especialmente eosinófilos, para a parede da via aérea, ocasionando modificações irreversíveis na estrutura tecidual dos pulmões, como o espessamento da membrana basal, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais e da camada muscular lisa peribrônquica, com produção de um fenômeno conhecido como remodelamento das vias aéreas [2, 22].

Outra característica importante do remodelamento pulmonar são as alterações estruturais das vias aéreas através da deposição de matriz extracelular como de fibras elásticas e colágeno [21].

1.1.3.2 Resposta imunológica na asma alérgica

A asma é uma doença de resposta alérgica e inflamatória adaptativa em decorrência de imunização prévia a um antígeno específico, com resposta característica predominantemente de linfócitos T auxiliares (Th do inglês, *T helper*) do tipo 2 (Th2) [23].

A troca de classe que leva o linfócito T auxiliar 0 (Th0), ou T *naïve*, a diferenciar-se em Th1, Th2 ou Th17 em uma resposta alérgica, é desencadeada

pela interação de moléculas co-estimulatórias presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC do inglês, *antigen presenting cell*) com os linfócitos T, além do estímulo dado pela liberação de citocinas específicas [24-26].

Didaticamente e de forma simplificada, o antígeno inalado entra primeiramente em contato com o epitélio brônquico e também com leucócitos presentes na luz das vias aéreas e espaços aéreos [27]. A resposta imunológica alérgica é iniciada no contato do antígeno com as vias aéreas, quando as células epiteliais são estimuladas a produzirem citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão responsáveis pela ativação das células inflamatórias, o que as recrutará para as vias aéreas a partir dos sistemas circulatório e linfático [28-30]. Após serem ativados pelas quimiocinas, os receptores nos leucócitos iniciam uma complexa cascata de sinalização que leva à ativação de moléculas de adesão e seus ligantes na superfície celular. Essas moléculas são essenciais para que ocorra a migração, rolamento e a adesão das células de defesa aos locais envolvidos no processo inflamatório [31, 32].

A partir do momento em que o antígeno atravessa a barreira epitelial, diversas células podem desempenhar a função de captar e apresentar o antígeno aos linfócitos, como os macrófagos, que são as células de defesa em maior número no pulmão e são especializadas em fagocitar patógenos, mas também são capazes de apresentar antígenos. Esta célula pode ser diferenciada em M1 (macrófago tipo 1), que é o macrófago inflamatório e mais comum em doenças não alérgicas, e M2 (macrófago tipo 2) macrófago alveolar, também chamado de

residente no pulmão e que está ligado às doenças alérgicas como a asma [33]. O M1 é ativado em lesões agudas, enquanto o M2 é ativado como uma alternativa de limitar ou sanar um processo inflamatório e que além disso possui grande potencial de promover fibrose [34, 35].

Dentre as APCs, as células dendríticas (DCs do inglês, *Dendritic Cells*) que são especializadas na apresentação antigênica no pulmão, emergiram como pivôs no balanço imunológico das vias aéreas [36, 37]. O resultado da resposta imune adaptativa na asma depende do contexto no qual o antígeno é encontrado pelas DCs e é predominantemente definido pela presença ou ausência de sinais de perigo no sítio de exposição [38-40].

Diferentes tipos de DCs podem ser encontrados no organismo, dependendo do local onde residem, cada qual com sua especialização e fenotipagem. Os subtipos de DCs são: células dendríticas plasmocitoides (pDCs do inglês, *plasmacytoid Dendritic Cells*) e células dendríticas convencionais (cDCs do inglês, *common Dendritic Cells*), que ainda podem ser subdivididas em cDC CD103⁺ (CD do inglês, *Cluster of Differentiation*), cDC CD11b⁺ e cDC CD8α⁺ (também chamadas de células dendríticas linfoides) [41].

As DCs fagocitam o antígeno e ao processá-lo passam por um processo de maturação enquanto migram para os linfonodos onde irão ativar células Th0. As cDCs CD11b⁺ são as primeiras células a serem ativadas após a interação com o alérgeno e as citocinas liberadas pelo epitélio, que em seguida vão ativar basófilos e as ILC2s (do inglês, *group 2 innate lymphoid cells*) a produzirem interleucinas

(IL) 4 e/ou IL-13. Estas citocinas favorecem a polarização dos linfócitos Th0, pelas células dendríticas, para que ocorra a troca de classe para Th2 e consequentemente reduzindo a tolerância à antígenos inalados [42]. As cDC CD8 α ⁺ estão localizadas em órgãos como o baço e os linfonodos por isso recebem o nome de células dendríticas linfoides [43].

As APCs ao serem ativadas expressam moléculas co-estimulatórias que juntamente com seus receptores e/ou ligantes presentes nos linfócitos T, irão direcionar a resposta inflamatória. O MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) é uma molécula expressa pelas APCs, responsável pela apresentação do antígeno e como consequência gera uma resposta específica através de linfócitos T CD4⁺ (Linfócito T auxiliar) ou T CD8⁺ (Linfócito T Citotóxico) [44]. O MHC de classe II (MHC II) é mais comum na asma e interage com os linfócitos T CD4⁺ enquanto o MHC classe I (MHC I) ativa linfócitos T CD8⁺ em doenças virais [45, 46]. Além do MHC II, as DCs expressam moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80, CD86, ICOSL, PDLs, que quando expressas indicam ativação das células e podem contribuir para aumentar ou regular o processo inflamatório nas vias aéreas [47, 48].

Para que haja geração e perpetuação da resposta imune típica Th2 na asma, é preciso que sejam liberadas citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 é capaz de induzir o recrutamento de eosinófilos, estimular as células produtoras de muco e perpetuar a ativação de mastócitos, além de estimular os linfócitos B a produzirem anticorpos antígeno-específicos [49]. Os anticorpos produzidos pelos linfócitos B

na asma são chamados de imunoglobulinas (Ig) como a IgE, a qual é a principal imunoglobulina responsável pela degranulação de mastócitos [2, 49].

A IL-5 é uma citocina altamente específica para a ativação, recrutamento e supressão de apoptose de eosinófilos [50-52]. Embora o eosinófilo também possa agir como célula apresentadora de antígeno, sua principal função é mediar a resposta inflamatória através da liberação de citocinas e de grânulos de proteínas tóxicas, como a peroxidase eosinofílica, que lesam o tecido pulmonar, gerando hiperresponsividade e remodelamento das vias aéreas [53, 54].

A IL-13 é uma citocina que age diretamente sobre o epitélio brônquico, contribuindo para o aumento da responsividade e remodelamento das vias aéreas na asma. Estudos *in vitro* demonstram que IL-13 é a principal citocina responsável pela proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno [23, 55, 56]. A resposta de IL-13 é mediada por TGF- β (do inglês, *transforming growth factor*- β) que por sua vez é liberado principalmente por macrófagos e eosinófilos. A liberação de TGF- β ativo, a partir da clivagem do complexo formado pelos polipeptídeos na membrana dos macrófagos e eosinófilos, irá gerar um ciclo entre metaloproteinase (MMP do inglês, *Matrix Metalloproteinase*) 9 e TGF- β . Neste processo, observamos um *feedback* positivo onde a metaloproteinase ativa a forma latente do TGF- β e este ativa maior expressão de MMP, ampliando o processo de remodelamento na asma [57-60].

Através da produção de IL-10, uma citocina com característica anti-inflamatória, as células T regulatórias (Tregs), desempenham papel essencial na

inibição da sensibilização na alergia e na produção de IgE em resposta à exposição antigênica [61, 62]. IL-10 proveniente de Tregs pode reduzir a expressão de MHC II e outras moléculas co-estimulatórias em células dendríticas além de estimulá-las a também liberar IL-10, amplificando e mantendo o processo de tolerância à antígenos [63].

A figura 1, a seguir, resume alguns dos eventos envolvidos na resposta imunológica da asma.

Figura 1 – Sensibilização das vias aéreas na indução de asma alérgica. A agressão ao epitélio com fumaça de cigarro fornece o primeiro sinal de perigo e ativa os receptores de sinalização inatos, levando a secreção de quimiocinas a partir das células epiteliais das vias respiratórias e atraindo as DCs imaturas para o epitélio. Uma vez ativadas, DCs processam os alérgenos capturados nas vias aéreas ou que já quebraram a barreira epitelial e maturam durante a migração para os linfonodos mediastinais onde vão interagir com as células T *naïve* para gerar a diferenciação destas células em Th2 ou Tregs. Por sua vez, os linfócitos direcionam-se para o sítio de inflamação.

1.1.4 Efeitos pulmonares do tabagismo na asma

O tabagismo é certamente um fator de risco importante para diversas doenças. Fumar é a maior causa de morte evitável e o principal fator de risco para câncer de pulmão, que por sua vez, é o maior responsável pela mortalidade por câncer em homens e a segunda causa de morte por câncer em mulheres no Brasil (incluindo-se também tumores nas regiões da boca, laringe e esôfago) [64]. Além disso, cerca de 20% dos tabagistas desenvolvem, ao longo dos anos, doença pulmonar obstrutiva crônica [65].

Estatísticas advindas de ensaios clínicos e dados epidemiológicos suportam o papel ativo do cigarro no desenvolvimento e na gravidade da asma [66, 67]. Estudos prévios têm demonstrado que a exposição prolongada à fumaça do cigarro pode ser muito mais irritativa em indivíduos asmáticos quando comparada

a indivíduos não-asmáticos, provavelmente devido à amplificação do processo inflamatório [66, 67].

O tabagismo ativo interage com o fenótipo da asma, causando sintomas alérgicos mais graves e maior declínio na função pulmonar [68, 69]. De maneira semelhante, o fumo passivo, também conhecido como fumo involuntário ou ambiental também pode potencializar o declínio da função pulmonar, bem como a eficácia terapêutica de corticosteroides orais de curta duração, além de colaborar para uma sintomatologia exacerbada em indivíduos já sensibilizados [70].

A gravidade da asma tem forte e direta correlação com o tabagismo, e alguns estudos sugerem até um risco de aumento de incidência de asma brônquica em pessoas que fumaram por 3 anos ou mais [70]. Adolescentes que começaram a fumar têm um risco potencial aumentado de desenvolver asma, embora haja pouca informação a respeito do efeito do tabagismo ativo em adolescentes já sensibilizados a algum tipo de alérgeno [70].

Do ponto de vista imunológico, o papel das DCs na exacerbação da inflamação pulmonar induzida pela fumaça de cigarro ainda é controverso. A capacidade da DC para gerar imunidade Th1 ou Th2 é regulada por muitos fatores, porém está documentado que exposição à fumaça do cigarro pode inibir a função das DCs circulatórias, resultando assim, na inibição específica da produção de citocinas-chave Th1 e favorecendo o desenvolvimento de respostas do tipo Th2. Este fenômeno também pode diminuir a capacidade de ativação das DCs,

reduzir as atividades endocítica e fagocítica, além de reduzir a liberação de IL-10 [71, 72].

Todavia, a alta complexidade biomolecular da exposição à fumaça de cigarro sobre os pulmões pode gerar resultados surpreendentes. Em estudo similar a este e realizado em nosso laboratório, foi demonstrado que a exposição à fumaça do cigarro de animais com inflamação crônica de vias aéreas resultou em um significativo aumento na produção de IL-10, sugerindo a participação de células regulatórias no processo inflamatório induzido pelo fumo em um processo alérgico [73].

Entretanto, ainda são necessários diversos tópicos elucidativos relativos aos componentes do complexo processo inflamatório na asma e sua relação com o tabagismo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi analisar os mecanismos como, perfil celular pulmonar e sistêmico, e o perfil das células dendríticas envolvidas na modulação da inflamação alérgica pulmonar acrescida da exposição à fumaça do cigarro em um modelo clássico de sensibilização e desafios inalatórios com OVA.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a responsividade brônquica
- 2) Avaliar a produção sérica de IgE
- 3) Avaliar os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias
- 4) Avaliar o remodelamento epitelial e peribroncovascular
- 5) Avaliar o perfil inflamatório presente no lavado broncoalveolar, pulmões e linfonodos mediastinais
- 6) Avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro sobre a maturação de células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs do inglês, *Bone Marrow Dendritic Cells*)
- 7) Avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro sobre a capacidade migratória de BMDCs

- 8) Avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro sobre a capacidade fagocítica de BMDCs
- 9) Avaliar o efeito do extrato da fumaça de cigarro sobre a expressão gênica de IL-13 e MUC5ac de BMDCs

3. HIPÓTESE DE TRABALHO

Baseados em estudos prévios sobre inflamação pulmonar alérgica crônica combinada ou não a exposição à fumaça de cigarro, geramos a hipótese de que a fumaça do cigarro age sobre o perfil celular inflamatório da asma, especificamente sobre as células dendríticas, fazendo com que as alterações causadas nestas células sejam as responsáveis pelas mudanças na resposta imunológica da asma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Baseados na literatura sobre modelos murinos de asma, foram utilizados camundongos Balb/c, machos, com idade entre 6 a 8 semanas, pesando 20 a 25g, livres de patógenos específicos (SPF do inglês, *Specific Pathogen Free*) provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) [74, 75].

Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Terapêutica Experimental 20 (LIM20) da FMUSP sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada, com água e ração *ad libitum*. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH) [76]. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 010/13).

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram randomicamente divididos em 4 grupos conforme a tabela 1.

Grupos experimentais

<i>SAL</i>	Animais não sensibilizados e não expostos à fumaça de cigarro
<i>F</i>	Animais não sensibilizados e expostos à fumaça de cigarro
<i>OVA</i>	Animais sensibilizados e desafiados com aerossol de ovalbumina e não expostos à fumaça de cigarro
<i>OF</i>	Animais sensibilizados e desafiados com aerossol de ovalbumina e expostos à fumaça de cigarro

Tabela 1 – Relação dos grupos experimentais.

4.3 Sensibilização e indução da inflamação pulmonar alérgica

Já está bem estabelecido na literatura que o processo de indução da inflamação, por meio de injeções intraperitoneais de OVA (ovalbumina) e desafios

inalatórios com o mesmo antígeno, produz significativa eosinofilia nas duas semanas iniciais de desafios e reduzida nas semanas subsequentes semelhante a asma em humanos [77]. O protocolo escolhido para este trabalho foi modificado a partir de outro trabalho similar realizado em nosso laboratório [73].

Os animais dos grupos OVA e OF receberam duas injeções intraperitoneais (i.p.), 0,2 mL, de solução contendo 20 µg de OVA (Sigma grau V) adsorvida em 3 mg/mL de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) (Pepsamar gel, Sanofi-Synthelabo S.A., Brasil) nos dias 0 e 14. Os grupos SAL e F receberam duas injeções i.p., 0,2 mL com solução salina (NaCl 0,9%) e 3 mg/mL de Al(OH)₃ nos mesmos dias que os grupos OVA e OF. Nos dias 21, 23, 25 e 27, os animais dos grupos sensibilizados (OVA e OF) foram colocados em uma caixa de exposição acoplada a um nebulizador ultrassônico (Pulmoclear II, Soniclear, Brasil) e submetidos à inalação de OVA diluída em NaCl 0,9% na concentração de 10 mg/mL (1%), por 30 minutos. Os grupos SAL e F foram expostos ao aerossol de NaCl 0,9% por 30 minutos nos mesmos dias e em diferente caixa e sistema de nebulização. Vinte e quatro horas após o último desafio antigênico, no dia 28, os animais foram submetidos a avaliações *in vivo* e amostras foram coletadas para futuras avaliações (figura 2).

4.4 Exposição à fumaça do cigarro

O modelo de exposição à fumaça de cigarro foi o mesmo utilizado em diversos estudos realizados e publicados em nosso laboratório [73, 78, 79]. A

exposição foi realizada em uma caixa de plástico de 28 L com duas entradas. Através da primeira entrada foi aplicado um fluxo de ar sintético e na segunda foi aplicado um fluxo de ar que passou por um Venturi conectado a um cigarro aceso, mantendo-se a concentração média de CO dentro da caixa entre 350-400 ppm (figura 3). Os animais dos grupos F e OF foram mantidos na caixa de fumaça por 30 minutos duas vezes ao dia, com intervalo entre as exposições de 2 horas, durante doze dias, aspirando a fumaça de sete cigarros sem filtro (Derby vermelho, Souza Cruz, Brasil – composição segundo o fabricante: alcatrão 10 mg, nicotina 0,8 mg, monóxido de carbono 10 mg) (figura 2).

Figura 2 – Protocolo experimental. Sensibilização via i.p. de OVA (20 µg/mL) ou solução NaCl 0,9% adsorvidos em 3 mg/mL de Al(OH)₃ nos dias 0 e 14. Desafios inalatórios de OVA 1% ou NaCl 0,9% durante 30 minutos nos dias 21, 23, 25 e 27. Exposição à fumaça de cigarro duas vezes ao dia durante 30 minutos do dia 16 ao dia 27. Eutanásia dos animais no dia 28.

Figura 3 – Esquema da exposição à fumaça de cigarro. Adaptado a partir de Biselli et al. 2011 [78].

4.5 Avaliação dos níveis de cotinina e carboxihemoglobina

Para garantir que os níveis de exposição à fumaça de cigarro estivessem adequados, sendo o suficiente para ativar o sistema imunológico, entretanto sem ser tóxico, os níveis de cotinina e carboxihemoglobina foram medidos, em 4 animais por grupo, imediatamente após a última exposição à fumaça de cigarro. Para a quantificação de cotinina sérica foi realizado ensaio imunoenzimático - ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de acordo com as normas do fabricante (Abnova, EUA). A leitura da densidade ótica (DO) da reação foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro (Spectramax L, Molecular Devices). As concentrações das amostras foram calculadas com regressão linear múltipla a

partir das DOs e das concentrações em ng/mL das curvas-padrão obtidas com recombinantes em programa de computador (Instat). Para a quantificação dos níveis de carboxihemoglobina, logo após a exposição à fumaça de cigarro, sangue venoso foi coletado via veia cava em animais anestesiados (thiopental sódico 33 mg/Kg, Thiopentax, Brasil). A avaliação foi realizada imediatamente após a coleta através de um analisador automático de gases (ABL800, EUA).

4.6 Avaliação da mecânica pulmonar

Vinte e quatro horas após o último desafio inalatório, 8 a 10 animais por grupo, foram anestesiados com thiopental sódico (33 mg/Kg, Thiopentax, Brasil), traqueostomizados e ventilados mecanicamente (Harvard 683, Harvard Apparatus, EUA) em um pletismógrafo de acrílico à 450 ciclos por minuto e volume de 10 mL/Kg. Foi acoplado à válvula inalatória do respirador, um inalador ultrassônico (RespiraMax, Brasil) que produziu, por 1 minuto, aerossol de solução salina ou de metacolina (Mch, Sigma-Aldrich, EUA) em concentrações crescentes de 3, 30 e 300 mg/mL. Foram adquiridos sinais nos 30° segundo, 1°, 2° e 3° minuto após a inalação. Os sinais de pressão traqueal e o volume pulmonar foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão (Honeywell 163PC01D36, EUA) e convertidos por placa analógica digital (DT01EZ, Data Translation, EUA). Os valores de elastância (E_{rs}) e resistência (R_{rs}) do sistema respiratório foram calculados através do programa de computador Anadat através da equação do movimento nas diversas concentrações de Mch e tempos pós exposição. Foram

analisados os valores basais e máximos de Ers e Rrs obtidos após a inalação de cada uma das concentrações de Mch.

4.7 Obtenção do plasma sanguíneo

Após a análise da mecânica respiratória foi realizada a coleta de 0,3 mL de sangue da veia cava inferior com seringa heparinizada em 8 a 10 animais por grupo. O sangue foi diluído em 600 µL de NaCl 0,9% e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4 °C. O plasma coletado foi armazenado a -80 °C para a posterior análise de anticorpos antígeno-específicos.

4.8 Análise histológica do pulmão

Para a determinação da morfologia geral, pulmões de 8 a 10 animais por grupo, foram retirados em bloco e o pulmão esquerdo insuflado com volume corrente de 0,3 mL de ar e mantido em formaldeído 4% por 24 horas. Então os pulmões foram desidratados em etanol 70% por 48 horas e emblocados em parafina. Foram realizados cortes de três seções do pulmão e corados com ácido periódico de *Shiff - alcian blue* (PAS-AB) para a análise de produção de muco e área de epitélio, e picrossírius para análise da deposição de colágeno. Para a quantificação do remodelamento do epitélio brônquico foi utilizado acoplado à objetiva do microscópio (Eclipse E200, Nikon Instruments, USA) um retículo

contendo 100 pontos e 50 retas com área conhecida de $10.000 \mu\text{m}^2$ com uma ampliação de 1000 x. Cinco vias aéreas, que coubessem inteiras no aumento de 400 x, foram analisadas em cada lâmina. Foram contados os pontos sobre o epitélio, pontos sobre o muco e retas que interceptavam a lâmina basal para então realizar o cálculo de área de epitélio e área de muco.

Para a determinação do remodelamento pulmonar por deposição de fibras colágenas, utilizamos análise de imagens obtidas por câmera acoplada à microscópio óptico (Leica, Alemanha). A quantificação da proporção de fibras elásticas e colágenas foi realizada por meio de análise de imagem utilizando o programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics Inc., USA).

4.9 Dosagem de IgE OVA-específica

A dosagem de anticorpos antígeno-específicos foi realizada por ELISA em plasma de 8 a 10 animais por grupo. Para determinação de IgE, uma microplacade alta sensibilidade (Costar, EUA) foi sensibilizada com antígeno OVA ($10 \mu\text{g/mL}$) e posteriormente bloqueada para ligações inespecíficas com solução de albumina de soro bovino (10%). As amostras de plasma foram adicionadas em uma diluição previamente determinada através de diluição seriada e encubaram durante a noite a 4°C . Então, foi adicionado anticorpo de detecção específico para IgE (SouthernBiotech, EUA), e a placa revelada com solução de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, Thermo, EUA). A reação foi interrompida com

adição de solução ácida (H_2SO_4 , 4N) e a densidade óptica (DO) foi determinada por espectrofotometria a 490 nm (Spectramax L, Molecular Devices, USA).

4.10 Dosagem de citocinas

Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β no homogenato de pulmão foram determinados por ELISA (R&D System, EUA) em amostras de 8 a 10 animais por grupo, seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, microplacas de alta sensibilidade (Costar, EUA) foram sensibilizadas para cada citocina com anticorpos monoclonais específicos. Após a lavagem, bloqueio de ligações inespecíficas seguida de lavagem, distribuição e incubação com as amostras, foram adicionados anticorpos conjugados à biotina específicos para as diferentes citocinas. Para a revelação, solução reveladora, contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada (R&D System, EUA). A reação foi interrompida com adição de solução ácida (H_2SO_4 , 2N). A leitura da DO foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro (Spectramax L, Molecular Devices, EUA). As concentrações das amostras foram calculadas com regressão linear múltipla no programa InStat a partir das DOs e das concentrações em pg/mL das curvas-padrão obtidas com as respectivas citocinas recombinantes.

4.11 Análise do perfil inflamatório por citometria de fluxo

Em um ensaio específico para este fim, 8 animais por grupo, foram primeiramente anestesiados com thiopental sódico (33 mg/Kg, Thiopentax, Brasil) e em seguida eutanasiados por secção da aorta abdominal. Posteriormente, foram obtidas células do lavado broncoalveolar (LBA), pulmão e linfonodos mediastinais como descrito a seguir. Os pulmões foram lavados com três alíquotas de 0,5 mL de NaCl 0,9% para coleta do LBA, que foi então centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensionado em 1000 µL de NaCl 0,9% para contagem total das células inflamatórias em câmara de Neubauer. Então, os linfonodos mediastinais foram removidos e homogeneizados em salina utilizando uma peneira de 40 µm (B&D biosciences, EUA). Os pulmões foram retirados e cortados com tesoura e incubados por 30 minutos a 37 °C em solução contendo collagenase (0,7 mg/mL) (Sigma Aldrich, EUA) and DNase1 (30 µg/mL) (Sigma Aldrich, EUA). Após a incubação, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato – PBS (do inglês, *phosphate-buffered saline*) acrescido de soro fetal bovino a 2% para bloquear a ação das enzimas. As células foram centrifugadas e resuspensas em 1 mL de solução salina para contagem total em câmara de Neubauer. A suspensão celular do LBA, pulmões e linfonodos, foi contada e ajustada para 5×10^5 células/mL e dividida em tubos de poliestireno e incubadas com os anticorpos marcados com fluorocromos para análise por citometria de fluxo.

As diferentes populações celulares foram identificadas pelo uso de anticorpos monoclonais específicos marcados com fluorocromos (B&D biosciences e eBioscience, EUA). As células do LBA e dos pulmões foram previamente incubadas com o anticorpo anti-CD16/CD32 por 10 minutos a 4 °C, afim de bloquear os receptores Fc.

Em seguida as células foram marcadas com os seguintes anticorpos:

<i>Compartimento</i>	Marcadores
<i>LBA e pulmões</i>	Anti- : CD3, CD4, CD11b, CD11c, F4/80, Ly6CeG, MHCII, B220, SiglecF
<i>Pulmões e linfonodos</i>	Anti- : CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD69, Foxp3, CD11b, CD11c, PDCA1, B220, CD80, CD86, PDL2, ICOSL, MHC II, CD8α

Tabela 2 – Tabela de anticorpos de acordo com os compartimentos.

Após a marcação com os anticorpos, as células foram lavadas e ressuspensas com 200 µL de PBS e 100 µL de formaldeído 1% e acondicionadas a 4 °C para leitura no citômetro de fluxo FACS Fortessa (B&D biosciences, EUA). No dia da leitura das células pelo citômetro, para a marcação intracelular de Foxp3, as células foram primeiramente permeabilizadas com saponina 0,5% e posteriormente incubadas com o anticorpo anti-Foxp3 por 30

minutos a 4 °C. Em seguida as células marcadas foram lavadas e ressuspensas em 300 µL de PBS e acondicionadas a 4 °C para leitura no citômetro de fluxo. Aproximadamente 100.000 eventos foram adquiridos e analisados com o programa FlowJo v10.2 (EUA).

Para a diferenciação e análise de ativação celular foi considerada a seguinte fenotipagem:

Célula	Marcadores
Eosinófilo	CD3 ⁻ , SSC-A ^{lo} *, SiglecF ⁺
Neutrófilo	CD3 ⁻ , SSC-A ^{lo} , Ly6CeG ^{hi} *
Macrófago intersticial/M1	B220 ⁺ , CD11c ⁺ , MHC II ⁺ , F4/80 ⁺ , CD11b ⁺ , SiglecF ⁻
Macrófago alveolar/ M2	B220 ⁺ , CD11c ⁺ , MHC II ⁺ , F4/80 ⁺ , CD11b ⁺ , SiglecF ⁺
Linfócito TCD4	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ (ativação por CD69 ⁺)
Linfócito TCD8	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ (ativação por CD69 ⁺)
Linfócito Treg	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , Foxp3 ⁺
CD11b⁺ DC	CD11c ⁺ , MHC II ^{hi} , B220 ⁺ , CD24 ⁺ , CD11b ^{hi}
pDC	CD11c ^{int/+} , MHC II ^{lo} B220 ⁺ , CD24 ⁺ , PDCA1 ⁺
DC linfoide (CD8α⁺ DC)	CD11c ⁺ , MHC II ⁺ , B220 ⁺ , CD8α ⁺

Tabela 3 – Tabela de anticorpos de acordo com a diferenciação celular. *

Representa a intensidade da marcação em que *hi* (do inglês, *high*) = alta intensidade, *int* (do inglês, *intermediate*) = intensidade intermediária e *lo* (do inglês, *low*) = baixa intensidade.

A estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo para cada tipo celular encontra-se no Anexo.

4.12 Diferenciação de células dendríticas derivadas da medula óssea (*Bone Marrow Dendritic Cell* - BMDC)

Para o uso nos ensaios *in vitro*, 4 Balb/c foram eutanasiados e os fêmures e tíbias foram removidos. As medulas ósseas foram lavadas com 5 mL de PBS estéril utilizando-se uma seringa e em seguida centrifugadas por 7 minutos, a 1200 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as hemácias lisadas com solução de lise (eBiosciences, EUA) de acordo com as normas do fabricante. A solução contendo as células foi novamente centrifugada, sendo o botão celular ressuspenso em 5 mL de PBS. A contagem total do número de células foi feita em diluição 1:20 de azul de tripano (Sigma, EUA) em câmara de Neubauer. As células foram cultivadas na concentração de $1,5 \times 10^6$ células/mL em frascos de cultura (T75) com 20 mL de meio RPMI 1640 (Gibco – Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina, 0,1% 2-mercaptoetanol, 1% aminoácidos não-essenciais, 1% piruvato de sódio, 0,1% de penicilina/estreptomicina e 10 ng/mL de GM-CSF a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂/95% ar. No terceiro dia, 10 mL de meio foram retirados dos frascos de cultura, centrifugados por 7 minutos, a 1200 rpm a 4 °C. O botão celular foi ressuspenso em 10 mL de meio suplementado acrescido de GM-CSF (10

ng/mL) e a solução celular foi devolvida ao respectivo frasco de cultura. No dia 6, as células aderentes e as células suspensas no sobrenadante foram coletadas, lavadas e centrifugadas por 10 minutos, a 1200 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular ressuspenso em 1 mL de meio suplementado. Em placa de 12 poços, $1,5 \times 10^6$ células foi adicionada por poço para então serem estimuladas.

4.13 Preparação do extrato da fumaça de cigarro e estimulação das células

A fumaça de 2 cigarros sem filtros (Derby vermelho, Souza Cruz, Brasil, composição - alcatrão 10 mg, nicotina 0,8 mg, monóxido de carbono 10 mg) obtida na queima através de aparato acoplado a seringa de 50 mL, foi borbulhada em 20 mL de meio de cultura RPMI 1640, obtendo-se assim o extrato da fumaça de cigarro – CSE (do inglês, *cigarette smoke extract*). O extrato foi filtrado com filtro de 0,20 µm para esterilização e usado imediatamente a uma concentração de 5% por poço, por 24 horas. Experimentos prévios para a análise da concentração ideal de extrato de fumaça de cigarro foram realizados com o objetivo de obter a ativação das BMDCs sem que houvesse morte celular.

4.14 Análise do efeito da OVA e/ou do extrato de fumaça de cigarro sobre as BMDCs por citometria de fluxo

Para avaliar o efeito da OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro sobre a maturação, ativação e capacidade de migratória das BMDCs, células imaturas (dia 6 do protocolo, $1,5 \times 10^6$ células/mL) foram estimuladas com OVA (100 µg/mL) por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂/95% ar. Após 24 horas de estímulo com OVA, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 10 minutos, a 1200 rpm a 4°C. O botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de meio suplementado acrescido de GM-CSF para então se estimular as células com extrato de fumaça de cigarro (5%) por 24 horas adicionais. Ao final das 24 horas de estímulo com extrato de fumaça de cigarro, as células aderentes e suspensas no sobrenadante foram coletadas e centrifugadas por 10 minutos, a 1200 rpm a 4 °C. O botão celular foi marcado com anticorpos para análise por citometria de fluxo.

Para avaliar o efeito do extrato de fumaça de cigarro sobre a capacidade fagocítica das BMDCs, as células imaturas, dia 6 do protocolo, foram expostas ao extrato da fumaça de cigarro (5%) por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂/95% ar. Após estímulo com extrato de fumaça de cigarro, o meio de cultura foi renovado e as células foram então pulsadas por mais 24 horas a 37 °C na presença de OVA marcada com fluorocromo fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (100 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific, EUA) em meio de cultura suplementado acrescido de GM-CSF para avaliação por citometria de fluxo. Com fins

qualitativos, foram realizadas capturas de imagens deste mesmo grupo em microscópio com câmera acoplada e filtro TRITC, com ampliação de 400 x. (Zeiss West Germany).

Para a análise de maturação, ativação, capacidade migratória e fagocítica, foi considerada a seguinte fenotipagem:

Análise	Marcadores
Maturação das BMDCs	Viabilidade, CD11c ^{hi} , CD11b ⁺ , MHC II ⁺ , F4/80 ⁻
Capacidade migratória das BMDCs	Viabilidade, CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , MHC II ^{hi} , CCR7 ⁺ , F4/80 ⁻
Capacidade fagocítica das BMDCs	Viabilidade, OVA-FITC ⁺ , CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , MHC II ^{hi} , F4/80 ⁻

Tabela 4 – Tabela de anticorpos de acordo com a análise de maturação, ativação, capacidade migratória e fagocítica das BMDCs. * Representa a intensidade da marcação em que *hi* (do ingles, *high*) = alta intensidade.

A estratégia de análise dos dados obtidos por citometria encontra-se no Anexo.

4.15 Análise do efeito da OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro sobre a capacidade inflamatória das BMDCs

Para verificarmos se a ação da fumaça de cigarro sobre as células dendríticas está relacionada à inflamação na asma, realizamos a análise de

expressão gênica de IL-13 (sequências: mL-13 progressivo – 5' – GTC CAC ACT CCA TAC CAT GC – 3' e mL-13 regressivo – 5' – GAT CTG TGT CTC TCC CTC TGA – 3') e Muc5ac (sequências: m muc5ac progressivo – 5' – CCC ATG TGT ATT CCT CTC CCA 3' e mMuc5ac regressivo – 5' – CTG GTT GAG TGG TTG TGT GT – 3') (Integrated DNA Technologies, EUA) pelo método PCR quantitativo em tempo real (do inglês, *quantitative real time-polymerase chain reaction* - qRT-PCR). BMDCs estimuladas por 24 horas com OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro, foram coletadas e mantidas congeladas a -80 °C com 1 mL trizol (Thermo Fisher Scientific, EUA) até a realização das análises. As amostras foram então descongeladas para a extração de RNA (do inglês, *ribonucleic acid*). Amostras em trizol foram centrifugadas por 10 minutos, a 1500 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi separado em novo tubo e acrescido de 200 µL de clorofórmio (Sigma, EUA) e centrifugado novamente por 10 minutos, a 12000 rpm a 4 °C. Somente a fase clara, superior, foi separada e acrescida de 500 µL de isopropanol (Sigma, EUA) 100% e centrifugada novamente por 10 minutos, a 12000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o botão de RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% e ressuspendido em 25 µL de água livre de nuclease. A quantidade de RNA foi quantificada por espectrofotometria (Thermo Scientific Nano Drop One, EUA) para que fosse realizada a purificação da amostra através do tratamento com Dnase (Dnase I amplification grade, Invitrogen, EUA) de acordo com as normas do fabricante. Em seguida, foi realizada reação de PCR para criação de DNA complementar – cDNA (do inglês, *complimentary DNA*) (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Invitrogen, EUA) de acordo com as normas do fabricante,

em *Thermal Cycler* (BioRad Mycycler, EUA) utilizando um ciclo de 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 30 minutos e 95 °C por 5 minutos. A partir da obtenção de cDNA, foi realizada a reação de qRT-PCR para quantificação da expressão gênica, com amostra diluídas 1:5 em água livre de nuclease, utilizando Agilent AriaMx Real-Time PCR system e o programa Agilent AriaMx 1.2 (Agilent Technologies, EUA).

4.16 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas através da análise de variância para dois fatores Two-Way ANOVA seguida dos testes de Holm-Sidak para múltiplas comparações ou t de Student para comparar apenas 2 grupos (SigmaStat2.03, SPSS, EUA). Resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Níveis de cotinina e carboxihemoglobina

Foi realizada a validação da exposição à fumaça de cigarro pois a exposição exagerada à fumaça de cigarro não só não mimetiza o fumo humano como pode ser tóxica aos animais [80, 81].

Como previsto, os níveis de cotinina e carboxihemoglobina encontraram-se aumentados somente nos grupos expostos à fumaça de cigarro e dentro dos limites observados e preconizados na literatura (Figura 4 e 5).

Figura 4 – A exposição à fumaça de cigarro eleva a cotinina a níveis de humanos fumantes crônicos. A cotinina sérica mostrou-se elevada apenas nos animais expostos à fumaça de cigarro, porém em níveis considerados seguros. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 5 – A exposição à fumaça de cigarro eleva o nível de carboxihemoglobina (COHb) sérica de forma semelhante a humano fumante. Valores médios de COHb sérica comprovam a segurança do desenho experimental empregado. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

5.2 Responsividade brônquica

As curvas dose-resposta à metacolina obtidas podem ser observadas nas figuras 6A e 7A. Visando avaliar a reatividade brônquica foi calculada a resposta máxima obtida na curva dose-resposta à metacolina de cada grupo, tanto para elastância (Ers) como para resistência (Rrs) do sistema respiratório. Observou-se que a sensibilização e desafios inalatórios com OVA elevaram a resistência máxima, mas não a elastância do sistema respiratório. Entretanto a exposição à fumaça de cigarro não induziu alterações significativas na reatividade pulmonar independentemente da sensibilização antigênica. (Figuras 6A, 6B, 7A e 7B).

Figura 6 – A exposição à fumaça de cigarro não altera a reatividade pulmonar distal. Representação gráfica dos valores médios ($\pm$ erro padrão) de elastância do sistema respiratório (Ers) obtidos após inalações de doses crescentes de Mch (**A**). Não foram observadas diferenças significativas nos valores médios ($\pm$ erro padrão) de elastância máxima do sistema respiratório (R_{max}Ers) obtidos após a inalação de Mch (**B**).

A **B**

Figura 7 – A exposição à fumaça de cigarro não altera a reatividade pulmonar proximal induzida pela OVA. Representação gráfica dos valores médios ($\pm$ erro padrão) de resistência do sistema respiratório (Rrs) obtidos após inalações de doses crescentes de Mch (**A**). A sensibilização antigênica eleva a reatividade pulmonar proximal através do aumento nos valores médios ($\pm$ erro padrão) de resistência máxima do sistema respiratório (R_{max}Rrs) (**B**).

5.3 Remodelamento pulmonar

Neste estudo observou-se intenso processo de remodelamento pulmonar nos animais sensibilizados e desafiados com o antígeno através do aumento da deposição de colágeno nas vias aéreas, aumento da área de epitélio brônquico assim como a deposição de muco sobre o mesmo. A exposição à fumaça de cigarro sem prévia sensibilização, elevou a deposição de colágeno nas vias aéreas, entretanto não foram observadas alterações na análise do epitélio. Interessantemente, a combinação do fumo com a inflamação alérgica não levou a potencialização na deposição de colágeno (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 8 – O fumo por si só induziu a deposição de fibras colágenas embora a co-exposição não apresente potencialização deste efeito. Observa-se na representação gráfica e nas fotomicrografias ilustrativas (400 x) a elevação na deposição de fibras colágenas no espaço peribroncovascular induzida pelo fumo ou pela OVA, sem potencialização do efeito na presença de ambos. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p = 0,006$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 9 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz o remodelamento epitelial brônquico. A área epitelial mostra-se elevada nos animais sensibilizados e a co-exposição à fumaça de cigarro reduz esse efeito. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 10 – A co-exposição à fumaça de cigarro também reduz a produção epitelial de muco. Valores da área de muco presente na camada epitelial apontam para um maior acúmulo nos animais sensibilizados e que se mostra reduzida na co-exposição ao fumo. * $p = 0,046$ quando comparados os grupos OF ao F. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OVA a SAL. # $p = 0,002$ quando comparado ao grupo OVA.

5.4 Imunoglobulina antígeno-específica sérica e citocinas no pulmão

Na análise da produção de anticorpos OVA-específicos no plasma, notou-se que o processo de sensibilização elevou os níveis destes anticorpos. Os altos níveis de IgE presentes nos animais sensibilizados mantiveram-se elevados quando houve a combinação a exposição à fumaça de cigarro (Figura 11).

Quantificou-se ainda, as principais citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias descritas como participantes no processo inflamatório da asma. Observou-se que

a sensibilização aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias presentes no pulmão como IL-4, IL-5 e IL-13, bem como de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . A combinação da exposição à fumaça de cigarro com sensibilização e desafios inalatórios reduziu os níveis de todas as citocinas supracitadas (Figuras 12 e 13). Enquanto que a exposição à fumaça de cigarro isoladamente, elevou a produção de TGF- β (Figura 13).

Figura 11 – A co-exposição à fumaça de cigarro manteve elevada a produção sérica de IgE OVA-específica no plasma induzida pela sensibilização antigênica. Valores médios de densidade óptica (DO) obtidos em ensaio imunoenzimático apontam elevação na produção de imunoglobulina (Ig) E nos animais sensibilizados e a co-exposição à fumaça de cigarro mantém elevada essa produção. * $p = 0,001$ quando comparados os grupos OVA ao SAL. * $p = 0,013$ quando comparados os grupos OF ao F.

Figura 12 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduziu a produção de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar induzida pela sensibilização antigênica. Os níveis de IL-4, -5 e -13 presentes no homogenato pulmonar mostram-se elevados nos animais sensibilizados e a co-exposição à fumaça de cigarro reduz a produção de todas as citocinas inflamatórias analisadas. IL-4: * $p = 0,009$ quando comparado ao grupo SAL. # $p = 0,029$ quando comparado ao grupo OVA. IL-5: * $p = 0,01$ quando comparado ao grupo SAL. # $p = 0,041$ quando comparado ao grupo OVA. IL-13: * $p = 0,016$ quando comparado ao grupo SAL. # $p = 0,026$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 13 – A co-exposição ao fumo reduz os elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias induzidos pela OVA enquanto que exposição ao fumo por si só eleva a produção de TGF- β . Os níveis de citocinas encontradas no homogenato pulmonar mostram-se elevados nos animais sensibilizados pela OVA e reduzem na co-exposição à fumaça de cigarro. Interessantemente, de modo pró-fibrótico, os níveis de TGF- β encontram-se elevados nos animais expostos apenas ao fumo. IL-10: * $p < 0,001$ quando comparado aos grupos controle (SAL ou F). # $p = 0,005$ quando comparado ao grupo OVA. TGF- β : * $p = 0,005$ quando comparados os grupos OVA ao SAL. * $p = 0,002$ quando comparados os grupos OF ao F. # $p = 0,029$ quando comparado ao grupo OVA.

5.5 Granulócitos e macrófagos no lavado broncoalveolar e pulmão

Primeiramente foi analisado o infiltrado inflamatório presente na luz das vias aéreas, através da avaliação das células presentes no LBA.

Observou-se que o número de eosinófilos e de macrófagos M1 mostraram-se elevados nas vias aéreas do grupo OVA. Porém, a combinação do fumo com a inflamação alérgica reduziu o influxo destas células (Figuras 14 e 15). Entretanto, o fumo por si só induziu maior influxo de macrófagos do tipo M1 na luz das vias aéreas. (Figura 15). Em relação aos macrófagos M2, observou-se aumento nos grupos expostos à fumaça de cigarro, independentemente da sensibilização antigênica (Figura 16).

Interessantemente, na análise celular no tecido pulmonar, observou-se aumento significativo no número de neutrófilos nos animais sensibilizados e co-expostos à fumaça de cigarro (Figura 17).

Figura 14 – A co-exposição ao fumo reduz o influxo de eosinófilos na luz das vias aéreas de animais sensibilizados. O número de eosinófilos no LBA mostrou-se elevado nos animais sensibilizados ao antígeno e tal influxo reduziu na presença da fumaça de cigarro. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 15 – De forma independente, fumo e sensibilização antigênica elevam o influxo de macrófagos do tipo 1 (M1) à luz das vias aéreas. O número de M1 mostrou-se elevado nos animais expostos à fumaça de cigarro ou ao antígeno OVA separadamente, entretanto a co-exposição de ambos fatores reduz o influxo destas células. * $p = 0,005$ quando comparados os grupos F ao SAL. * $p = 0,027$ quando comparados os grupos OVA ao SAL. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OF ao OVA. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 16 – A exposição à fumaça de cigarro induz maior influxo de macrófagos do tipo 2 (M2) na luz das vias aéreas independentemente da sensibilização antigênica. O número de M2 presentes no LBA mostrou-se elevado nos grupos F e OF. A sensibilização antigênica não alterou o influxo deste tipo celular. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p = 0,012$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 17 – A co-exposição ao fumo eleva o número de neutrófilos no homogenato pulmonar. O número de neutrófilos presentes no homogenato de tecido pulmonar apresenta-se elevado nos animais sensibilizados e co-expostos à fumaça de cigarro. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo F. # $p = 0,003$ quando comparado ao grupo OVA.

5.6 Linfócitos no pulmão

Na análise de linfócitos do tipo T CD4⁺, T CD8⁺ e Tregs no pulmão, observou-se aumento no recrutamento destas células para os pulmões de animais sensibilizados e desafiados com OVA. No grupo sensibilizado e co-exposto à fumaça de cigarro (OF) observou-se aumento significativo no número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ bem como maior ativação dos linfócitos T CD8⁺ (Figuras 18, 19 e 20). As células Tregs pulmonares, mostraram-se elevadas nos animais sensibilizados com OVA, porém a co-exposição à fumaça de cigarros gerou redução no recrutamento destas células (Figura 21).

Figura 18 – A co-exposição ao fumo exacerba o influxo pulmonar de linfócitos T CD4⁺ induzido pela inflamação alérgica. O número de linfócitos T CD4⁺ presentes no homogenato de tecido pulmonar mostra-se elevado nos animais sensibilizados pela OVA e a co-exposição à fumaça de cigarro amplifica esse influxo. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OVA ao SAL e OF ao F. # $p = 0,005$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 19 – A co-exposição ao fumo amplifica o já elevado influxo pulmonar de linfócitos T CD8⁺. O número de linfócitos T CD8⁺ encontrados no homogenato de tecido pulmonar mostra que a sensibilização antigênica gera maior influxo pulmonar destas células e a co-exposição à fumaça de cigarro gera amplificação deste fenômeno. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OVA ao SAL e OF ao F. # $p = 0,048$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 20 – A co-exposição à fumaça de cigarros também eleva a ativação celular destes linfócitos T CD8⁺ pulmonares. O número de linfócitos T CD8⁺ presentes no homogenato pulmonar expressando CD69 mostram-se elevados no grupo co-exposto à OVA e ao fumo. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo F. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 21 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz o influxo pulmonar de células Treg nos animais sensibilizados com OVA. O número de Tregs no homogenato apresenta-se elevado nos animais sensibilizados pelo antígeno OVA e a co-exposição à fumaça de cigarro reduz esse componente regulatório. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OVA ao SAL. * $p = 0,043$ quando comparados os grupos OF ao F. # $p = 0,031$ quando comparado ao grupo OVA.

5.7 Células dendríticas no pulmão e nos linfonodos mediastinais

Ao analisar o fenótipo das DCs no pulmão, observou-se que a inflamação pulmonar alérgica elevou o recrutamento de pDCs para os pulmões além de aumentar a ativação destas células por expressão de CD86, ICOSL e PDL2 (Figuras 23 e 24). Contrariamente, no grupo OF, houve significativa redução de CD11b⁺ DCs em relação ao grupo F (Figuras 22) além de redução de pDCs e ativação por moléculas co-estimulatórias (Figuras 23 e 24).

Na análise de DCs nos linfonodos mediastinais, observou-se aumento de CD8α⁺ DCs no grupo OVA. A combinação de inflamação alérgica e exposição à fumaça de cigarro, aumentou expressivamente o recrutamento dessas células nos linfonodos (Figura 25).

Figura 22 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz o influxo pulmonar de célula dendrítica CD11b⁺. No homogenato pulmonar observa-se redução de DC CD11b⁺ nos animais co-expostos à OVA e ao fumo em relação ao grupo F. * p = 0,017 quando comparados os grupos OF ao F.

Figura 23 – A co-exposição ao fumo reduz o número de células dendríticas plasmocitoides (pDCs) no pulmão. A sensibilização ao antígeno OVA gera um número maior de pDCs pulmonares e a co-exposição à fumaça de cigarro reduz esse número. * $p < 0,001$ quando comparados ao grupo SAL. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 24 – A co-exposição à fumaça de cigarro reduz a ativação das pDCs amplificando o perfil pró-inflamatório. A sensibilização eleva a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD86, ICOSL e PDL2 nas pDCs pulmonares e a co-exposição ao fumo reduz a expressão de todas elas. CD86 e PDL2: * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SAL. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA. ICOSL: * $p = 0,04$ quando comparado ao grupo F. # $p = 0,04$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 25 – A co-exposição à fumaça de cigarro elevou significativamente o número de CD8α⁺ DC nos linfonodos mediastinais. A sensibilização à OVA elevou o influxo de CD8α⁺ DC e a co-exposição ao fumo elevou de maneira expressiva a presença deste tipo celular. * $p = 0,043$ quando comparados os grupos OVA ao SAL. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OF ao F. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA.

5.8 Maturação, ativação, capacidade migratória e fagocítica das BMDCs

Visando melhor compreender o efeito da fumaça de cigarro sobre as células dendríticas, foram realizados ensaios *in vitro* de células dendríticas oriundas de medula óssea (BMDC) avaliando-se a maturação, ativação e capacidade migratória e fagocítica destas células pulsadas com o antígeno OVA e/ou expostas ao extrato da fumaça de cigarro.

O estímulo com OVA, ou a exposição ao extrato de fumaça de cigarro, ou mesmo na combinação destes, não afetaram a viabilidade das células nas concentrações e tempos de exposição estudados (Figura 26).

Para avaliação da maturação celular quantificou-se a expressão de CD11c e MHC II. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados na análise de maturação por expressão de CD11c nas BMDCs (Figura 27), porém, houve aumento significativo da expressão de MHC II das células expostas a OVA e leve redução na combinação de exposição ao extrato de fumaça de cigarro (Figura 28). Visando avaliar a capacidade migratória das BMDCs avaliou-se a expressão do receptor de quimiocinas CCR7. A combinação de OVA e extrato de fumaça de cigarro aumentou a expressão de CCR7 pelas BMDCs (Figura 29), o que indica aumento da capacidade migratória destas células. Para avaliar a capacidade fagocítica, realizou-se ensaio com OVA marcada com FITC e

observou-se que a co-exposição ao antígeno e ao extrato fumaça de cigarro elevou a fagocitose do antígeno marcado (Figura 30).

Figura 26 – A viabilidade das BMDCs não foi afetada pela exposição ao extrato de fumaça de cigarro. BMDCs imaturas pulsadas com OVA (100 $\mu\text{g/mL}$) (O e OF) e/ou expostas ao extrato de fumaça de cigarro (5%) não tiveram afetadas sua viabilidade celular.

Figura 27 – A expressão CD11c em BMDC não se alterou com pulso com OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro. BMDCs imaturas pulsadas com OVA e/ou expostas ao extrato de fumaça de cigarro não apresentaram alterações na expressão de CD11c.

Figura 28 – A exposição ao extrato de fumaça de cigarros reduz levemente a elevação da expressão de MHC II em BMDC pulsada com OVA. BMDCs imaturas pulsadas com OVA apresentaram superexpressão de MHC II e a exposição ao extrato de fumaça de cigarro reduziu levemente esse fenômeno, embora ainda

mantenha elevado. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OVA ao MEIO e OF ao F. # $p = 0,009$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 29 – A exposição ao extrato de fumaça de cigarros eleva a capacidade migratória das BMDcs pulsadas com OVA. As médias de intensidade de fluorescência (do inglês, *mean fluorescence intensity* - MFI) de CCR7, receptor de quimiocinas, mostram-se elevadas nas BMDcs pulsadas com OVA e expostas ao extrato de fumaça de cigarro. * $p = 0,013$ quando comparado ao grupo F. # $p = 0,024$ quando comparado ao grupo OVA.

Figura 30 – A exposição ao extrato de fumaça de cigarros eleva a capacidade fagocítica de BMDCs. Ensaio de fagocitose foi realizado com BMDCs expostas ou não ao extrato da fumaça de cigarro demonstrou elevação da capacidade fagocítica de OVA marcada pelas células expostas ao extrato de fumaça de cigarro (F). # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 31 – Fotos ilustrativas de BMDCs no aumento de 400 x: à esquerda BMDCs não expostas ao extrato de fumaça de cigarro (CSE) e expostas a OVA-FITC; à direita BMDCs expostas ao CSE e posteriormente expostas à OVA-FITC.

5.9 Expressão gênica de IL-13 e Muc5ac em BMDCs

Ao avaliar se a exposição ao antígeno OVA e/ou extrato de fumaça de cigarro altera a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios como IL-13 e Muc5ac em BMDC, notou-se aumento da expressão de IL-13 nas células pulsadas com OVA, em contrapartida, a co-exposição ao extrato de fumaça de cigarros reduz esse padrão inflamatório (Figura 32). Não houve diferença estatística na análise de expressão gênica de Muc5ac nas BMDCs estudadas (Figura 33).

Figura 32 – BMDCs pulsadas com OVA e expostas ao extrato da fumaça de cigarro apresentam reduzida a expressão de IL-13. A análise de expressão gênica mostra que as BMDCs pulsadas com OVA apresentam redução no ΔCT , indicando elevação na expressão de IL-13 e que a exposição ao extrato de cigarro reverte essa superexpressão nas células pulsadas com o antígeno. * $p = 0,017$ quando comparados os grupos OVA ao SAL. * $p < 0,001$ quando comparados os grupos OF ao F. # $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA. Nota: ΔCT = Diferença entre o gene de interesse (IL-13) menos o gene sempre expresso (18s); os níveis de ΔCT são inversamente proporcionais a quantidade de ácido nucleico alvo na amostra.

Figura 33 – O extrato da fumaça de cigarro não altera a expressão gênica de Muc5ac em BMDC. Não se observa alterações na expressão de MUC5ac nas células pulsadas com OVA e/ou expostas ao extrato da fumaça de cigarro.

6. DISCUSSÃO

A exposição de aeroalérgenos em animais previamente sensibilizados gera uma cascata de eventos inflamatórios característicos da resposta Th2 que resulta em disfunção pulmonar na asma [82]. Estudos que combinaram inflamação alérgica pulmonar e fumaça de cigarro relataram tanto atenuação [83] como exacerbação [70] da resposta imune. Neste estudo optou-se por um modelo clássico para induzir a inflamação pulmonar alérgica crônica com ovalbumina (OVA) a fim de estudar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a inflamação. Para isto foi utilizado um sistema de exposição à fumaça de cigarro em que as exposições foram quantificadas e podem ser facilmente reproduzidas [78, 84]. É importante notar que resultados divergentes podem ocorrer entre diferentes estudos devido às diferentes formas de se fazer a exposição à fumaça de cigarro, diferentes concentrações de fumaça de cigarro, diferentes tipos de cigarros, diferentes linhagens de animais e diferentes fenótipos de asma [85].

O monóxido de carbono (CO) tem afinidade pela hemoglobina aproximadamente 230 vezes maior do que o oxigênio, resultando na formação de COHb (carboxihemoglobina). Os níveis de COHb podem se elevar a mais de 10% em fumantes intensos, enquanto fica em torno de 4-6% em fumantes leves, comparado a 1-2% em não fumantes [80]. A cotinina, por sua vez, é o principal metabólito da nicotina e é considerado o melhor parâmetro para avaliar a exposição ao tabaco e o status tabágico devido a sua maior estabilidade e meia-

vida quando comparado à nicotina. Ao analisar os níveis de cotinina e carboxihemoglobina (COHb) observamos que houve aumento somente nos grupos expostos à fumaça de cigarro, independentemente do fato de serem alérgicos ou não. Os níveis de COHb nestes grupos é compatível a um indivíduo considerado fumante intenso. Em nosso estudo observamos que o nível de cotinina esteve alto comparado aos grupos não expostos à fumaça. Xu e colaboradores relatam que o nível sérico de cotinina deve ser cerca de 1,1 ng/mL para não fumantes, 1,7 ng/mL para fumantes passivos e acima de 10 ng/mL para fumantes ativos dependendo do tempo de exposição, corroborando com nosso estudo em que a exposição ativa e prolongada ao fumo elevou os níveis de cotinina acima de 25 ng/mL [81].

Como esperado e já visto em modelo semelhante, a sensibilização e desafios inalatórios com OVA causaram intenso infiltrado inflamatório pulmonar, aumento da responsividade brônquica à metacolina, aumento da produção de anticorpos específicos para OVA como IgE, exacerbação do processo de remodelamento das vias aéreas impulsionado por fibras colágenas, hipertrofia/hiperplasia de células epiteliais e aumento da produção de muco, assim como aumento produção de citocinas inflamatórias no pulmão [73]. Embora a exposição à fumaça de cigarro associada à sensibilização com OVA tenha causado redução do processo de remodelamento das células epiteliais brônquicas, esta combinação aumentou o recrutamento de neutrófilos e macrófagos tipo 2, além de ter elevado no número de linfócitos T CD4⁺ e o número e ativação de linfócitos T CD8⁺. Ainda, a

inflamação alérgica combinada com exposição à fumaça de cigarro diminuiu o número de células regulatórias como Tregs e pDCs.

Já está descrito o importante papel da fumaça de cigarro no agravamento da asma, caracterizado pelo aumento de neutrófilos e com maior remodelamento das pequenas vias aéreas, resultando num aumento da obstrução ao fluxo de ar [86]. Neste estudo mostramos que o fumo quando combinado com a sensibilização embora reduza o número de eosinófilos nas vias aéreas, eleva o número de neutrófilos infiltrados no pulmão, corroborando em parte com o descrito por Price D. et al, 2014. Outros estudos demonstram que a combinação de inflamação pulmonar alérgica com fumo aumenta o influxo de eosinófilos no LBA [83, 87] o que não ocorre no modelo aqui estudado. Uma das causas para redução do influxo de eosinófilos é redução na produção de IL-5 nos animais alérgicos co-expostos ao fumo [52]. O eosinófilo é uma célula com características inflamatórias e na asma está associado a um aumento da capacidade de resposta das vias aéreas à diversos estímulos além de induzir e perpetuar a inflamação crônica [88]. Isso nos fez acreditar que outros mecanismos estariam envolvidos na indução e perpetuação da inflamação e assim estudarmos outras possíveis causas.

A inflamação da asma acrescida de exposição ao fumo também é caracterizada por elevação no influxo de macrófagos que levam ao maior remodelamento das vias aéreas [86]. No grupo OF observou-se um aumento significativo do número de macrófagos alveolares (M2) em relação ao grupo OVA. Estas células estão diretamente envolvidas com remodelamento brônquico, em

nosso estudo podemos observar aumento no número dessas células em ambos os grupos expostos à fumaça de cigarro, entretanto observamos remodelamento de vias aéreas reduzido no grupo OF [33]. Também notamos redução no número de macrófagos tipo 1 (M1) no grupo OF em relação aos grupos F e OVA. A queda no número de M1 pode levar à susceptibilidade à infecção [89] levando a inflamação alérgica para outra direção que não a Th2.

O declínio da função pulmonar foi observado com o aumento de resistência somente nos animais sensibilizados e que não foram expostos à fumaça de cigarro, o que está diretamente relacionado aos resultados de produção de IL-13 que se mostrou elevada no grupo OVA e reduzida no OF em relação a este grupo, reforçando assim a ligação desta citocina com a hiperresponsividade brônquica além do remodelamento. A IL-13 é produzida e liberada por leucócitos recrutados para as vias aéreas e é uma citocina-chave contribuindo para hiperresponsividade brônquica e remodelamento na asma [55]. Contraditoriamente aos nossos resultados obtidos no grupo OF, outros estudos mostraram que animais sensibilizados expostos à fumaça do cigarro tem aumentados os níveis de IL-13 associado a um processo de remodelamento instalado nas vias aéreas [90, 91]. Além de IL-13, a citocina TGF- β é outro importante mediador de remodelamento envolvido no processo de inflamação pulmonar alérgica crônica [57]. Nosso estudo mostrou aumento no processo de remodelamento causado pela OVA, acompanhado por elevação na produção de ambas as citocinas IL-13 e TGF- β . Além disso, os animais não alérgicos e que foram expostos ao fumo apresentaram

elevação nos níveis de TGF- β em magnitude semelhante àquela observada nos animais asmáticos embora não tenham apresentado remodelamento significativo. Entretanto, a combinação da sensibilização com exposição ao fumo, reduziu o remodelamento através da redução na área de epitélio e deposição de muco sobre o mesmo, além de diminuir na produção de colágeno. Tais efeitos foram paralelamente acompanhados pela redução nos níveis de IL-13 e TGF- β . Nossos dados contrariam ainda outros estudos que sugeriram que a fumaça de cigarro provoca um aumento da produção de TGF- β , exacerbando a inflamação das vias aéreas e amplificando o processo de remodelamento na asma, o que não ocorreu no modelo usado em nosso estudo [92, 93].

A IL-4 é uma citocina inflamatória Th2 envolvida com a resposta imune da asma e promove a mudança de isotipo das células B e colabora com o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas [49]. Por sua vez, as células B têm capacidade bem conhecida para produzir anticorpos do tipo IgE específicos, após terem sido induzidas por IL-4 [94]. Em nosso modelo, encontramos um aumento da produção de IL-4 em animais que foram sensibilizados, acompanhado de uma produção maciça de anticorpos IgE no mesmo grupo. A combinação da inflamação e exposição ao fumo, reduziu significativamente a produção de IL-4, porém não alterou a produção de IgE. Corroborando com nossos achados, um estudo com sensibilização e desafios com OVA acrescido de exposição prolongada à fumaça de cigarro, mostrou resultados semelhantes, sugerindo que, neste tipo de modelo, a fumaça de cigarro não é capaz de aumentar produção de

anticorpos a níveis ainda mais elevados do que aqueles já observados nos animais alérgicos [73].

Também já foi demonstrado que a fumaça de cigarro tem efeito imunomodulador na asma, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos [95]. A redução de IL-4, IL-5 e IL-13 pode indicar que a exposição à fumaça de cigarro alterou a resposta imune Th2 característica da resposta alérgica.

Contudo, além dos níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias, também se verificou uma diminuição de citocina anti-inflamatória como IL-10, no grupo OF. A IL-10 tem uma função reguladora inibindo a apresentação de antígenos por macrófagos [96]. Foi descrito que camundongos deficientes de IL-10 não desenvolvem hiperreatividade de vias aéreas após a sensibilização e desafio a alérgenos, apesar de uma resposta inflamatória pulmonar significativa que inclui o aumento da eosinofilia nas vias respiratórias [97]. Em nosso modelo observamos redução nos níveis de IL-10 indo de encontro a estudo semelhante em que, animais sensibilizados expostos à fumaça de cigarro mostraram aumento da produção de IL-10, porém, no estudo descrito os animais foram expostos à fumaça de cigarro apenas uma vez ao dia [73]. Além disso, observamos diminuição no número de células Treg, possivelmente devido aos níveis reduzidos de IL-4 e IL-10, como descrito acima. Estas citocinas estimulam DCs, principalmente pDCs, a polarizarem células T *naïve* para se tornarem células T reguladoras (T regs) [63]. As Tregs ativadas produzem e liberam mais IL-10, que ativa mais pDCs, levando a

um sistema de *feedback* positivo imunorregulador [98]. Interessantemente, também encontramos no nosso estudo redução no número de pDCs e com redução na expressão de moléculas co-estimulatórias que poderiam estar controlando a inflamação alérgica combinada com o efeito agressivo da fumaça de cigarro. Além disto, já foi relatado que pDCs desempenham papel protetor, reduzindo recrutamento de M2 para as vias aéreas e bloqueando apresentação antigênica, porém apenas em estágios iniciais do desenvolvimento da reposta inflamatória da asma quando combinada com exposição à fumaça de cigarro [99].

Observamos ainda que a fumaça de cigarro combinada com sensibilização e desafios inalatórios com OVA promoveu significativo aumento no número de CD8 α ⁺ DCs nos linfonodos mediastinais, acompanhado de aumento no número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e bem como maior ativação por expressão de CD69 no pulmão. CD8 α ⁺ DCs desempenham um papel protetor na asma, reduzindo a hiperresponsividade e produzindo altos níveis de IL-10 [43], o que não foi observado neste modelo provavelmente devido ao número reduzido de Tregs. Outro possível mecanismo responsável pela imunomodulação causada pela exposição à fumaça de cigarro observada neste modelo, é que as células T CD8⁺ ativadas aumentam a apoptose das células inflamatórias e consequentemente reduzem os níveis de citocinas inflamatórias liberadas por elas [100].

Nos ensaios feitos *in vitro*, observamos que BMDCs estimuladas com OVA e extrato de fumaça de cigarro, embora não tenham apresentado alteração no padrão de maturação, apresentaram redução na expressão de MHC II quando

comparado ao grupo OVA. BMDCs podem precisar de mais estímulos além do alérgeno para maturarem e serem ativadas, como por exemplo quando estimuladas com IL-4, BMDCs expressam em alta intensidade marcadores como CD40, CD86 e MHC II [101]. Apesar dos resultados de maturação e ativação, observamos que BMDCs previamente estimuladas com o alérgeno e em seguida de extrato de fumaça de cigarro, aumentaram sua capacidade fagocítica bem como a expressão de CCR7, o que caracteriza um aumento da capacidade migratória destas células e consequentemente potencial inflamatório. Para que haja a resposta inflamatória característica da asma é preciso que as DCs, ao captar o antígeno, migrem para os linfonodos para então polarizarem linfócitos T e dar sequência na resposta imune adaptativa [36, 102]. Além disto, a redução da expressão gênica de IL-13 relaciona-se com os dados encontrados desta citocina produzida no pulmão de camundongos do grupo OF, reforçando a necessidade de IL-13 para aumento do remodelamento pulmonar [16].

Estes resultados sugerem que DCs sensibilizadas e então expostas à fumaça de cigarro aumentam sua capacidade migratória, fagocítica e pró-inflamatória, o que leva a uma exacerbação da resposta imune, com aumento no recrutamento de células efetoras por exemplo, T CD4⁺ e T CD8⁺ como observadas neste estudo.

7. CONCLUSÕES

Com este estudo, demonstramos que há mais de uma via para regular a inflamação alérgica das vias aéreas causada por OVA e exposição à fumaça de cigarro. Como observamos, nos estágios tardios da inflamação e após a exposição crônica ao fumo, células dendríticas linfoides, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel importante no efeito prejudicial da exposição à fumaça de cigarro. Apesar da redução nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, ainda podemos observar os danos causados pela fumaça de cigarro com o aumento do número de células pró-apoptóticas como linfócitos T CD8⁺ e sua ativação nos animais sensibilizados e desafiados. Acreditamos que novos estudos são necessários para esclarecer como a fumaça de cigarro atua na regulação da asma e sugerimos mais estudos sobre mecanismos inter e intracelulares que possam estar envolvidos no direcionamento dos resultados aqui demonstrados, a fim de melhorar o entendimento e futuros tratamentos para esta doença.

ANEXO – ESTRATÉGIAS DE ANÁLISE DE CITOMETRIA

Figura 1 – Estratégia de análise para eosinófilos no LBA e neutrófilos no pulmão. Eosinófilos foram considerados CD3/B220 negativos, baixo FSC-A (do inglês, *forward scatter – area*, relativo ao tamanho das células) e SiglecF positivo. Neutrófilos foram considerados CD3/B220 negativos, baixo FSC-A e Ly6C/G^{hi}*. * Representa a intensidade da marcação em que *hi* (do inglês, *high*) significa alta intensidade.

Figura 2 – Estratégia de análise para macrófagos do tipo 1 (M1) e tipo 2 (M2) no LBA. Macrófagos foram considerados CD3/B220 positivos, CD11c positivos, MHC II positivos, F4/80 positivos, CD11b^{lo}. Foram considerados M1 macrófagos positivos para SiglecF e M2 negativos para este marcador. * Representa a intensidade da marcação em que *lo* (do inglês, *low*) significa baixa intensidade.

Figura 3 – Estratégia de análise para linfócitos T CD4⁺, Treg, T CD8⁺ e ativação de T CD8⁺ no pulmão. Linfócitos T CD4⁺ foram considerados CD3 positivos e CD4 positivos. Treg foram consideradas CD3 positivas, CD4 positivas, CD25 positivas e Foxp3 positivas. Linfócitos T CD8⁺ foram considerados CD3 positivos, CD8 positivos e ativados quando positivos para CD69.

Figura 4 – Estratégia de análise para CD11b⁺ DCs no pulmão. CD11b⁺ DCs foram consideradas CD11c positivas, MHC II positivas, CD24 positivas, B220 positivas e CD11b^{hi*}. Foram consideradas ativas as CD11b⁺ DCs que eram CD86 positivas. * Representa a intensidade da marcação em que *hi* (do inglês, *high*) significa alta intensidade.

Figura 5 – Estratégia de análise para pDCs no pulmão. pDCs foram consideradas CD11 negativas, MHC II positivas ou *low* (baixa intensidade), CD24 positivas, B220 positivas e PDCA1 positivas. Foram consideradas ativas as pDCs que eram CD86, ICOSL ou PDL2 positivas.

Figura 6 – Estratégia de análise para CD8α⁺ DCs nos linfonodos mediastinais. CD8α⁺ DCs foram consideradas CD11 positivas, MHC II positivas e CD8α positivas.

Figura 7 – Estratégia de análise para BMDcs. Primeiramente, foi realizada a análise de viabilidade em que células negativas para o marcador foram consideradas vivas. Em seguida, foi feita a exclusão de macrófagos, em que BMDcs foram consideradas negativas para o marcador F4/80. BMDcs maduras foram consideradas duplo-positivas para os marcadores CD11b e CD11c. A ativação foi avaliada em células consideradas maduras, através da positividade para o marcador MHC II. A capacidade migratória das BMDcs foi avaliada através da positividade para o marcador CCR7 em células maduras. Por fim, a capacidade fagocítica das BMDcs foi analisada através da positividade para OVA-FITC em células maduras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GINA, *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 2015.
2. NIH, N.I.o.H., *National Heart, Lung and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3 - Guidelines for the diagnosis and management of asthma*. 2007.
3. *II Consenso Brasileiro no Manejo da Asma* 1998, J. Pneumol.
4. SBPT, S.B.d.P.e.T., *III Consenso Brasileiro no manejo da asma*. J Bras Pneumol 2002. **28** (Supl 1).
5. SBPT, S.B.d.P.e.T., *Diretrizes para o Manejo da Asma* J Bras Pneumol, 2012. **38**(1).
6. SBPT, S.B.d.P.e.T., *IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma*. J Bras Pneumol, 2006. **32**(Supl 7): p. S 447-S 474.
7. Beggs, S., et al., *Swimming training for asthma in children and adolescents aged 18 years and under*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **4**: p. CD009607.
8. Mendes, F.A., et al., *Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial*. Chest, 2010. **138**(2): p. 331-7.
9. Morton, A.R. and K.D. Fitch, *Australian association for exercise and sports science position statement on exercise and asthma*. J Sci Med Sport, 2011. **14**(4): p. 312-6.
10. Tanaka, H., *Swimming exercise: impact of aquatic exercise on cardiovascular health*. Sports Med, 2009. **39**(5): p. 377-87.
11. Tse, K. and A.A. Horner, *Allergen tolerance versus the allergic march: the hygiene hypothesis revisited*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(6): p. 475-83.
12. Duran-Tauleria, E. and R.J. Rona, *Geographical and socioeconomic variation in the prevalence of asthma symptoms in English and Scottish children*. Thorax, 1999. **54**(6): p. 476-81.
13. Kim, H. and J.A. Bernstein, *Air pollution and allergic disease*. Curr Allergy Asthma Rep, 2009. **9**(2): p. 128-33.
14. *World Health Organization*. 04/05/2015]; Available from: <http://www.who.int/respiratory/asthma/scope/en/>.
15. Beran, D., et al., *Burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease and access to essential medicines in low-income and middle-income countries*. Lancet Respir Med, 2015. **3**(2): p. 159-70.
16. Wang, X., et al., *Lyn regulates mucus secretion and MUC5AC via the STAT6 signaling pathway during allergic airway inflammation*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42675.
17. Barnes, P.J., I.W. Rodger, and N.C. Thomson, eds. *Asthma: basic mechanism and clinical management*. 3ed ed. 1998, Academic Press Limited.
18. Kuwano, K., et al., *Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(5): p. 1220-5.
19. Hamid, Q. and M.K. Tulic, *New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma*. Ann Thorac Med, 2007. **2**(1): p. 28-33.
20. Chazal, I.d. and R.D. Hubmayr, *Novel aspects of pulmonary mechanics in intensive care*. Br J Anaesth, 2003. **91**(1): p. 81-91.

21. Dolhnikoff, M., et al., *The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1090-7, 1097 e1.
22. Bousquet, J., et al., *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1720-45.
23. Arima, M. and T. Fukuda, *Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma*. Korean J Intern Med, 2011. **26**(1): p. 8-18.
24. Liu, Y.J., et al., *TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 193-219.
25. Lombardi, V., A.K. Singh, and O. Akbari, *The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. **151**(3): p. 179-89.
26. Stockinger, B., M. Veldhoen, and B. Martin, *Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity*. Semin Immunol, 2007. **19**(6): p. 353-61.
27. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, eds. *Basc Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 3rd ed. 2009.
28. Conroy, D.M. and T.J. Williams, *Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung*. Respir Res, 2001. **2**(3): p. 150-6.
29. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
30. Sallusto, F., et al., *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 875-83.
31. Broide, D.H., et al., *Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 689-95.
32. Weller, C.L., P.J. Jose, and T.J. Williams, *Selective suppression of leukocyte recruitment in allergic inflammation*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 153-60.
33. Robbe, P., et al., *Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(4): p. L358-67.
34. Nair, M.G., et al., *Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung*. J Exp Med, 2009. **206**(4): p. 937-52.
35. Pechkovsky, D.V., et al., *Alternatively activated alveolar macrophages in pulmonary fibrosis-mediator production and intracellular signal transduction*. Clin Immunol, 2010. **137**(1): p. 89-101.
36. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 193-204.
37. Holt, P.G., et al., *Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 142-52.
38. Gallucci, S. and P. Matzinger, *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 114-9.
39. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
40. Shimizu, K. and S. Fujii, *An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 6193-201.
41. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *The immunology of asthma*. Nat Immunol, 2015. **16**(1): p. 45-56.
42. Oczypok, E.A., et al., *Pulmonary receptor for advanced glycation end-products promotes asthma pathogenesis through IL-33 and accumulation of group 2 innate lymphoid cells*. J Allergy Clin Immunol, 2015.

43. Stock, P., et al., *Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity*. Nat Immunol, 2004. **5**(11): p. 1149-56.
44. Roche, P.A. and K. Furuta, *The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 203-16.
45. Chen, F., et al., *Boosting immune response with the invariant chain segments via association with non-peptide binding region of major histocompatibility complex class II molecules*. BMC Immunol, 2012. **13**: p. 55.
46. van de Weijer, M.L., R.D. Luteijn, and E.J. Wiertz, *Viral immune evasion: Lessons in MHC class I antigen presentation*. Semin Immunol, 2015.
47. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
48. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
49. Schuijs, M.J., et al., *Cytokine targets in airway inflammation*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(3): p. 351-61.
50. Jeffery, P.K., *Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(10 Pt 2): p. S28-38.
51. Lukacs, N.W., *Role of chemokines in the pathogenesis of asthma*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 108-16.
52. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 147-74.
53. Gleich, G.J. and C.R. Adolphson, *The eosinophilic leukocyte: structure and function*. Adv Immunol, 1986. **39**: p. 177-253.
54. Padigel, U.M., et al., *Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to Strongyloides stercoralis*. Infect Immun, 2006. **74**(6): p. 3232-8.
55. Lee, C.G., et al., *Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 809-21.
56. Zimmermann, N., et al., *Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2): p. 227-42; quiz 243.
57. Mauviel, A., *Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis*. Methods Mol Med, 2005. **117**: p. 69-80.
58. Ohbayashi, H., *Matrix metalloproteinases in lung diseases*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(4): p. 409-21.
59. Ohno, I., et al., *Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(3): p. 212-9.
60. Santibanez, J.F., et al., *Transforming growth factor-beta1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(2): p. 267-73.
61. Faith, A., et al., *T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways*. Allergy, 2012. **67**(8): p. 1007-13.
62. Taylor, A., et al., *T regulatory cells and allergy*. Microbes Infect, 2005. **7**(7-8): p. 1049-55.
63. Steinbrink, K., et al., *CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2468-76.
64. INCA, *Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde do Brasil*. . 2003.

65. Oliveira, J.C.A.D., J.R.D.B. Jardim, and R. Rufino, *I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*. J Bras Pneumol, 2000. **26**(1).
66. Gilmour, M.I., et al., *How exposure to environmental tobacco smoke, outdoor air pollutants, and increased pollen burdens influences the incidence of asthma*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(4): p. 627-33.
67. Thomson, N.C., R. Chaudhuri, and E. Livingston, *Asthma and cigarette smoking*. Eur Respir J, 2004. **24**(5): p. 822-33.
68. Lazarus, S.C., et al., *Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(8): p. 783-90.
69. Thomson, N.C. and M. Spears, *The influence of smoking on the treatment response in patients with asthma*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(1): p. 57-63.
70. Moerlose, K.B., R.A. Pauwels, and G.F. Joos, *Short-term cigarette smoke exposure enhances allergic airway inflammation in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(2): p. 168-72.
71. Arnson, Y., Y. Shoenfeld, and H. Amital, *Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity*. J Autoimmun, 2010. **34**(3): p. J258-65.
72. Vassallo, R., et al., *Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2684-91.
73. Hizume, D.C., et al., *Cigarette smoke dissociates inflammation and lung remodeling in OVA-sensitized and challenged mice*. Respir Physiol Neurobiol, 2012. **181**(2): p. 167-76.
74. Takeda, K., et al., *Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(2): p. L394-402.
75. DI, K., *Beta2- agonista como imunomodulador da resposta inflamatória pulmonar crônica induzida em camundongos sensibilizados com ovoalbumina.*, in *School of Medicine*. 2004, University of Sao Paulo: Sao Paulo.
76. NIH, N.I.o.H. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 2011 [cited 2011 22/05/2012]; 8:[Available from: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>].
77. Shinagawa, K. and M. Kojima, *Mouse model of airway remodeling: strain differences*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(8): p. 959-67.
78. Biselli, P.J., et al., *Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling*. Braz J Med Biol Res, 2011. **44**(5): p. 460-8.
79. Toledo, A.C., et al., *Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke*. Eur Respir J, 2012. **39**(2): p. 254-64.
80. Macdonald, G., et al., *Reduction of carboxyhaemoglobin levels in the venous blood of cigarette smokers following the administration of carbogen*. Radiother Oncol, 2004. **73**(3): p. 367-71.
81. Xu, X., Y. Su, and Z.H. Fan, *Cotinine concentration in serum correlates with tobacco smoke-induced emphysema in mice*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 3864.
82. Jacobsen, E.A., et al., *Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation*. J Immunol, 2011. **187**(11): p. 6059-68.
83. Thatcher, T.H., et al., *High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(3): p. L412-21.

84. Lourenco, J.D., et al., *A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (Rhipicephalus Boophilus microplus) ameliorates emphysema in mice*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98216.
85. Raherison, C., et al., *Asthma phenotypes according to the timing of smoking onset in young adults*. Int J Tuberc Lung Dis, 2003. **7**(1): p. 84-92.
86. Price, D., et al., *Integrating evidence for managing asthma in patients who smoke*. Allergy Asthma Immunol Res, 2014. **6**(2): p. 114-20.
87. Lanckacker, E.A., et al., *Short cigarette smoke exposure facilitates sensitisation and asthma development in mice*. Eur Respir J, 2013. **41**(5): p. 1189-99.
88. Jung, J.W., et al., *Expression levels of eosinophil granule protein mRNAs in induced sputum reflect airway hyperresponsiveness and airflow limitation*. Tohoku J Exp Med, 2014. **233**(1): p. 49-56.
89. Byrne, A.J., et al., *Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways*. Thorax, 2015.
90. Botelho, F.M., et al., *Cigarette smoke differentially affects eosinophilia and remodeling in a model of house dust mite asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(4): p. 753-60.
91. Robbins, C.S., et al., *Mainstream cigarette smoke exposure attenuates airway immune inflammatory responses to surrogate and common environmental allergens in mice, despite evidence of increased systemic sensitization*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2834-42.
92. Guo, Z.H., Y.C. Du, and J.Y. Xu, *[The effect of cigarette smoke on the expression of transforming growth factor-beta1 mRNA and collagen type III in airways of asthmatic rats]*. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2008. **31**(1): p. 42-5.
93. Kim, D.Y., et al., *Cigarette smoke exacerbates mouse allergic asthma through Smad proteins expressed in mast cells*. Respir Res, 2011. **12**: p. 49.
94. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 693-704.
95. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-8.
96. Lewkowich, I.P., et al., *CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1549-61.
97. Makela, M.J., et al., *The failure of interleukin-10-deficient mice to develop airway hyperresponsiveness is overcome by respiratory syncytial virus infection in allergen-sensitized/challenged mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(6): p. 824-31.
98. Hansen, G., et al., *CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 61-70.
99. Ezzati Givi, M., et al., *Dendritic cells inversely regulate airway inflammation in cigarette smoke-exposed mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014: p. ajplung 00251 2014.
100. Suss, G. and K. Shortman, *A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1789-96.
101. Dewitte, H., et al., *Choose your models wisely: how different murine bone marrow-derived dendritic cell protocols influence the success of nanoparticulate vaccines in vitro*. J Control Release, 2014. **195**: p. 138-46.

102. Qin, Q., et al., *Lung dendritic cells undergo maturation and polarization towards a T helper type 2-stimulating phenotype in a mouse model of asthma: Role of nerve growth factor*. Exp Ther Med, 2014. **8**(5): p. 1402-1408.