SAMANTHA SOUZA POSSA

**Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias
com inflamação alérgica crônica: modulação da
inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas
inflamatórias, da matriz extracelular, do estresse
oxidativo e da reatividade de vias aéreas**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de F. L. Calvo Tibério

São Paulo

2012

SAMANTHA SOUZA POSSA

**Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias
com inflamação alérgica crônica: modulação da
inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas
inflamatórias, da matriz extracelular, do estresse
oxidativo e da reatividade de vias aéreas**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de F. L. Calvo Tibério

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Possa, Samantha Souza

Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com inflamação alérgica crônica: modulação da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas inflamatórias, da matriz extracelular, do estresse oxidativo e da reatividade de vias aéreas / Samantha Souza Possa. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério. .

Descritores: 1.Aasma 2.Cobaias 3.Quinases Associadas a rho

USP/FM/DBD-025/12

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Valter e Maria de Lourdes, por me mostrarem desde cedo os valores do estudo e da perseverança para atingir os objetivos.

Ao meu marido Alexandre, pelo intenso apoio e compreensão no caminho para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Iolanda Tibério, por me acolher em seu grupo de pesquisas e me permitir diretamente a realizar meu sonho de conquistar o doutorado. Sua dedicação e inteligência são admiráveis!

À Viviane Christina Ruiz Schütz, que me apresentou ao laboratório e à minha orientadora, contribuindo muito para meu ingresso na pós-graduação, além do imenso auxílio na minha inserção no universo da pesquisa experimental.

A Beatriz Romanholo, Carla Prado, Clarice Olivo, Edna Aparecida Leick, Milton Arruda Martins, Rafael Reis, Renato Righetti, Rosana Paz e a todo o pessoal do laboratório que direta ou indiretamente tenha contribuído para a concretização deste trabalho.

Às Professoras: Elia Caldini, Elnara Negri, Fernanda Lopes, Mariângela Macchione, Paulina Sannomiya e Vera Capelozzi, por participaram em meu exame de qualificação e contribuírem para o aperfeiçoamento desta Tese.

Muito obrigada a todos!

"Aquele que dúvida e não pesquisa torna-se não só infeliz, mas também injusto".

Blaise Pascal

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

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Asma Brônquica.....	2
1.1.1 Definição	2
1.1.2 Epidemiologia	4
1.1.3 Fisiopatogenia da Asma	6
1.1.3.1 Citocinas Inflamatórias na Asma.....	12
1.1.3.2 Remodelamento	16
1.1.3.2.1 Mecanismos do Remodelamento das Vias Aéreas	21
1.1.4 Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo	16
1.1.5 Modelos Experimentais de Asma	31
1.1.6 Diagnóstico	38
1.1.6.1 NO _{EX} no Diagnóstico e Controle da Asma	41
1.1.7 Tratamento.....	44
1.2 Rho Quinase	46
1.2.1 Propriedades Farmacológicas de Inibidores da Rho Quinase	48
1.2.2 Asma e Hiperresponsividade das Vias Aéreas	49
1.2.3 Contração Fisiológica do Músculo Liso	52
1.2.4 Sensibilização do Ca ²⁺ Mediada pela Rho Quinase em Músculos Lisos Alterados	55
1.2.5 Sensibilização do Ca ²⁺ Mediada pela Rho Quinase no Músculo Liso das Vias Aéreas	57
1.2.6 Outras Funções da Rho Quinase	59
1.2.6.1 Inflamação das Vias Aéreas	60
1.2.6.2 Remodelamento	62
1.2.6.3 Neuromodulação	63
1.2.6.4 Infecção Viral do Trato Respiratório.....	64

1.3 Justificativa do Estudo	64
2 OBJETIVOS	66
3 MÉTODOS	68
3.1 Animais	69
3.2 Grupos Experimentais	69
3.3 Indução da Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica	70
3.4 Tratamento com Y-27632	71
3.5 Mensuração do Óxido Nítrico Exalado	72
3.6 Avaliação da Mecânica Pulmonar	73
3.7 Estudos Morfométricos	75
3.7.1 Quantificação de Fibras Colágenas e Elásticas	76
3.7.2 Quantificação de Eosinófilos	77
3.7.3 Avaliação das Células Positivas para Citocinas	77
3.7.4 Avaliação da Expressão Celular de IFN-gama	78
3.7.5 Avaliação da iNOS	79
3.7.6 Avaliação do 8-isoprostano-PGF2 α	80
3.7.7 Avaliação da Expressão Celular de NF- κ B	80
3.7.8 Avaliação da Actina	81
3.7.9 Avaliação da Expressão Celular de MMP-9	83
3.7.10 Avaliação da Expressão Celular de TIMP-1	84
3.7.11 Avaliação da Expressão Celular de TGF-beta	85
3.8 Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP)	86
3.9 Análise Estatística	87
4 RESULTADOS	88
4.1 Tempo de Inalação	89
4.2 Óxido Nítrico Exalado	93
4.3 Avaliação da Mecânica Pulmonar	94
4.4 Análise Morfométrica	97
5 DISCUSSÃO	122
6 CONCLUSÕES	135
7 REFERÊNCIAS	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina bovina sérica
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
CD	Célula dendrítica
CLM	Cadeia leve da miosina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
CVF	Capacidade vital forçada
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacylglicerol
EAR	Resposta alérgica imediata
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase derivada do endotélio
Ers	Elastância do sistema respiratório
FE _{NO}	Concentração fracionária de óxido nítrico exalado
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GAPs	proteínas ativadoras de GTPases
GDI	Inibidores de dissociação de GTPase
GDP	Guanina difosfato
GEFs	Fatores de troca guanina nucleotídeo
Grupo OVA	Animais submetidos a inalação com solução de ovoalbumina
Grupo OVA-RHO	Animais submetidos a inalação de soro fisiológico e inalação de Y-27632 a partir da quinta inalação com de solução salina
Grupo SAL	Animais submetidos a inalação com solução salina
Grupo SAL-RHO	Animais submetidos a inalação de soro fisiológico e inalação de Y-27632 a partir da quinta inalação com

	solução salina
GTP	Guanina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRAV	Hiperresponsividade das vias aéreas
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISAAC	<i>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</i>
JNK	Proteína quinase C-Jun-terminal
LAR	Resposta alérgica tardia
LPA	Ácido lisofosfatídico
LSAB	Biotina-streptavidina peroxidase
MEC	Matriz extracelular
MF	Miosinofosfatase
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase
MQ	Miosinoquinase
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NF	Fator nuclear
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nNOS	Óxido nítrico sintase derivada dos neurônios
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Solução tampão salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEEP	Pressão positiva expiratória final
PFE	Pico de fluxo expiratório
PLC	Fosfolipase C
Ptr	Pressão traqueal
ROK	Rho quinase

ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rrs	Resistência do sistema respiratório
RS	Retículo sarcoplasmático
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	<i>T helper</i>
TI	Tempo de inalação
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T regulatória
V	Volume
V'	Fluxo
VEF ₁	Volume expiratório forçado em 1 segundo
VSR	Vírus sincicial respiratório

RESUMO

Possa SS. *Tratamento com inibidor da Rho quinase em cobaias com inflamação alérgica crônica: modulação da inflamação eosinofílica, da expressão de citocinas inflamatórias, da matriz extracelular, do estresse oxidativo e da reatividade de vias aéreas* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: Vários estudos têm mostrado a importância da Rho quinase na modulação da contração do músculo liso, hiperresponsividade das vias aéreas e inflamação. Entretanto, os efeitos do tratamento crônico com um inibidor específico desta via não haviam sido previamente investigados.

MÉTODOS: No presente estudo, foram avaliados os efeitos do tratamento crônico com Y-27632, um inibidor altamente seletivo Rho quinase, sobre a hiperresponsividade das vias aéreas, a ativação do estresse oxidativo, o remodelamento da matriz extracelular, a inflamação eosinofílica e a expressão de citocinas em um modelo animal de inflamação crônica das vias aéreas. As cobaias foram submetidas a sete inalações com ovalbumina ou solução salina (duas vezes por semana durante quatro semanas). Inalações com o inibidor da Rho quinase (Y-27632; 1mM) foram realizadas 10 min antes de cada exposição ao antígeno, começando na quinta inalação. Setenta e duas horas após a 7ª inalação, a avaliação da mecânica pulmonar foi realizada e o óxido nítrico exalado foi coletado. Os pulmões foram então removidos e a análise histológica foi realizada utilizando morfometria.

RESULTADOS: O tratamento com Y-27632 em animais sensibilizados reduziu o óxido nítrico exalado, as respostas máximas de resistência e elastância do sistema respiratório, o número de eosinófilos, o conteúdo colágeno e fibras elásticas, o número de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, iNOS, MMP -9, TIMP-1, TGF- β , NFkappa B e IFN- γ , e o conteúdo de 8-iso-PGF2 α em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$). Houve correlação positiva entre as respostas funcionais e os marcadores de inflamação, remodelamento e ativação da via de estresse oxidativo avaliados. **CONCLUSÕES:** A ativação da via da Rho quinase contribui para a potencialização da hiperresponsividade, inflamação, processo de remodelamento da matriz extracelular e ativação do estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que os inibidores da Rho quinase podem ser uma ferramenta farmacológica em potencial para o controle da asma.

Descritores: Asma, Cobaias, Quinases Associadas a rho

SUMMARY

Possa SS. *Treatment with Rho-kinase inhibitor in guinea pigs with chronic allergic inflammation: modulation of eosinophilic inflammation, expression of inflammatory cytokines, extracellular matrix, oxidative stress and airway responsiveness* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

INTRODUCTION: Several studies have shown the importance of Rho-kinase in the modulation of smooth muscle contraction, airway hyperresponsiveness and inflammation. However, the effects of chronic treatment with a specific inhibitor of this pathway had not been previously investigated. **METHODS:** We evaluated the effects of chronic treatment with Y-27632, a highly selective Rho-kinase inhibitor, on airway hyperresponsiveness, oxidative stress activation, extracellular matrix remodeling, eosinophilic inflammation and cytokines expression in an animal model of chronic airway inflammation. Guinea pigs were submitted to seven ovalbumin or saline exposures (twice a week for four weeks). Rho-kinase inhibitor (Y-27632; 1mM) was aerosolized 10 min before each antigen exposure, beginning at the 5th inhalation. Seventy-two hours after the 7th inhalation, pulmonary mechanics evaluation was performed and exhaled nitric oxide was collected. Lungs were removed and histological analysis was performed using morphometry. **RESULTS:** Treatment with Y-27632 in sensitized animals reduced exhaled nitric oxide, maximal responses of resistance and elastance of respiratory system, eosinophils, collagen and elastic fibers content, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, iNOS, MMP-9, TIMP-1, TGF- β , NFkappa B and IFN- γ positive cells, and 8-iso-PGF2 α content compared to the non-treated group ($P<0.05$). There were positive correlations among the functional responses and the markers of inflammation, remodeling and oxidative stress pathway activation evaluated. **CONCLUSIONS:** Rho-kinase pathway activation contributes to the potentiation of the hyperresponsiveness, inflammation, extracellular matrix remodeling process and oxidative stress activation. These results suggest that Rho-kinase inhibitors may be a potential pharmacological tool for controlling asthma.

Descriptors: Asthma, Guinea Pigs, rho-Associated Kinases

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma Brônquica

1.1.1 Definição

A asma é um sério problema de saúde global. Pessoas de todas as idades ao redor do mundo são afetadas por esta doença crônica pulmonar que, quando mal controlada, pode impor severos limites à vida diária e ser algumas vezes fatal (Bateman et al., 2008). Considerada uma condição heterogênea, a história natural da asma inclui deteriorações episódicas agudas (exacerbações) que revertem espontaneamente ou com tratamento, sobre um segundo plano de inflamação crônica persistente e/ou mudanças estruturais que podem estar associadas com sintomas persistentes e redução da função pulmonar (Reddel et al., 2009; GINA, 2010; Lemanske e Busse, 2010).

Definir a asma tem sido controverso e confuso, uma vez que não pode ser definida por uma causa, pois há várias, ou por patologia, porque as características patológicas comumente descritas não são específicas para asma (Hargreave e Nair, 2009). De modo geral, a asma é tradicionalmente definida como uma doença crônica caracterizada por hiperresponsividade brônquica e inflamação pulmonar, particularmente das vias aéreas

(Tattersfield et al., 2002). Embora útil este tipo de definição primária não permite distinguir a asma de outras doenças (Hargreave e Nair, 2009).

A definição mais adequada para a asma, elaborada pela *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2010), leva em consideração suas características clínicas, fisiológicas e patológicas, como se segue:

“A asma é uma desordem inflamatória crônica das vias aéreas, na qual muitas células e elementos celulares exercem função. A inflamação crônica está associada à hiperresponsividade das vias aéreas, que leva a episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã. Estes episódios estão normalmente associados a obstrução variável ao fluxo aéreo dentro dos pulmões, frequentemente reversível tanto espontaneamente quanto com tratamento”.

As vias aéreas de pacientes asmáticos são hiperresponsivas a uma ampla variedade de estímulos broncoconstritores (Hashimoto et al., 2002b). Os fatores subjacentes às exacerbações da asma incluem exposição a alérgenos, infecções virais, exercícios, irritantes, e ingestão de drogas antiinflamatórias não-esteroidais, entre outros (Lemanske e Busse, 2010). O estreitamento das vias aéreas em resposta a um estímulo não específico é uma das principais características da asma alérgica (Hanazaki et al., 2008).

É a hiperresponsividade brônquica a responsável pelos recorrentes episódios de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse (Brannan, 2010).

Para muitos indivíduos asmáticos, a doença tem sua origem durante a infância. Algumas destas crianças param com os chiados (chiadores transitórios), enquanto outras evoluem com sintomas persistentes que podem tanto se dissipar antes da adolescência (indivíduos primariamente

não atópicos) quanto continuar pela adolescência (indivíduos atópicos). Uma vez em remissão, a doença pode permanecer quiescente, ou o indivíduo pode apresentar recaídas mais tardiamente (Lemanske e Busse, 2010).

1.1.2 Epidemiologia

Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas são afetadas pela asma ao redor do mundo (Masoli et al, 2004), sendo que a prevalência global da doença varia entre 1-18% da população nos diferentes países (Bateman et al., 2008). A figura 1 mostra a distribuição de prevalência de asma ao redor do mundo.

Figura 1. Mapa do mundo de prevalência de asma clínica (Adaptado de: Masoli et al., 2004).

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

Embora com alta prevalência, no Brasil, o número de internações devido asma na rede pública de saúde caiu 51% nos últimos dez anos: diminuiu de 397.333, em 2000, para 192.601, em 2010 (DATASUS, 2011). Os fatores que podem ter contribuído para esta redução na morbidade incluem o desenvolvimento e implementação de programas para o tratamento de asma no país, como a oferta de medicação gratuita aos pacientes (Giavina-Bianchi et al., 2010).

A maioria dos pacientes apresenta doença leve, mas uma minoria significativa sofre de formas mais graves da doença, apesar de condutas médicas adequadas (Buc et al., 2009). Assim, embora incomum, a asma continua a causar mortes em alguns indivíduos. A asma fatal ocorre normalmente em um cenário de sintomas crônicos graves, frequentemente associado a anormalidades permanentes da função pulmonar, admissões

recorrentes ao hospital, uso incorreto de medicações, fatores psicológicos e subestimação da gravidade da doença (James e Wenzel, 2007).

1.1.3 Fisiopatogenia da Asma

A asma brônquica pode ocorrer em basicamente duas formas: não alérgica (intrínseca), quando ocorre espontaneamente; e alérgica, quando ocorre em resposta a gatilhos específicos, tais como exercício e tabagismo (Buc et al., 2009).

O processo inflamatório subjacente à asma resulta de uma interação altamente complexa de vários tipos de células. Nos aspectos inflamatórios da asma, processos alérgicos direcionados por imunoglobulina (Ig)E são as características predominantes da patologia das vias aéreas, sendo mastócitos, linfócitos T helper (Th)-2 e eosinófilos as células mais importantes (Lemanske e Busse, 2010). Além destas células inflamatórias, macrófagos e células teciduais estruturais também exercem importante função através da liberação de diversos mediadores, citocinas e quimiocinas (Chung e Barnes, 1999). A cadeia de citocinas associadas com os processos asmáticos frequentemente inclui interleucina (IL)-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Lemanske e Busse, 2010).

Uma vez em contato com o alérgeno, a resposta alérgica é desencadeada em indivíduos alérgicos. Esta resposta é composta por dois tipos de reações: uma imediata e outra tardia. A reação imediata é iniciada

logo após a ativação das células que liberam a IgE. É caracterizada pela rápida ativação de mastócitos e macrófagos das vias aéreas. As células ativas liberam mediadores que induzem contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudação de plasma, que pode comprometer a integridade epitelial (Bousquet et al., 2000).

A reação inflamatória tardia ocorre entre 6 a 9 horas após a provocação com o alérgeno e envolve o recrutamento e ativação de eosinófilos, células T CD4⁺, basófilos, neutrófilos e macrófagos. Há liberação de vários mediadores pró-inflamatórios e citocinas. Caracteriza-se por persistência das alterações presentes na fase imediata, bem como por aumento da hiperresponsividade brônquica não específica (Bousquet et al., 2000).

Em condições fisiológicas, o epitélio forma uma barreira altamente regulada e quase impermeável por intermédio da formação de junções estreitas. O campo de células epiteliais age como uma peneira molecular que exclui antígenos e patógenos inalados. Entretanto, alguns antígenos podem ser reconhecidos por células do sistema imunológico e induzir uma resposta imunológica. As células dendríticas (CDs) da mucosa são sentinelas extremamente eficazes na defesa contra o desafio com antígeno. Elas ficam posicionadas dentro do epitélio e estendem seus prolongamentos entre as células epiteliais diretamente para o lúmen das vias aéreas (Figura 2), operando um mecanismo de vigilância contínua das vias aéreas (Buc et al., 2009).

Figura 2. Célula dendrítica (CD) intercalando seus dendritos entre as células epiteliais, o que permite contato com o lúmen das vias aéreas. As células dendríticas formam as estreitas junções com células epiteliais através da expressão de moléculas adesivas e por interações E-cadherin (Adaptado de Buc et al., 2009).

A ativação das células dendríticas pelos alérgenos leva a uma cascata de eventos que culmina na produção de citocinas que atraem neutrófilos, monócitos e células dendríticas para as vias aéreas, além de transformar células T $CD4^+$ em células de perfil Th2 (Buc et al., 2009).

Os linfócitos Th2 ativados orquestram a cascata inflamatória. Quando ativada, a célula Th2 libera interleucinas, tais como IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 estimula os linfócitos a produzirem IgE, que então se liga à superfície dos mastócitos. Os mastócitos são importantes contribuintes tanto para a iniciação da asma com liberação de mediadores de fase aguda e, quando ativados, liberam algumas substâncias, incluindo IL-4, IL-5, histamina, leucotrienos e prostaglandinas. A IL-4 liberada dos mastócitos serve para perpetuar a produção de IgE e consequentemente dos eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5 especificamente recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendele et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010).

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

As células T exercem uma importante função nas respostas inflamatórias por intermédio de secreção de citocinas Th-1, tais como a IL-2 e o interferon (IFN)-gama, e citocinas Th-2, como IL-4 e IL-5 sob estimulação através de receptor de célula T (TCR). O equilíbrio Th2 está relacionado às manifestações fisiopatológicas da asma, e a via Rho/Rho quinase parece estar envolvida na ativação e função de células T via receptores de células T (TCR) (Cantrell, 2003).

A figura 3 mostra a cadeia de eventos da resposta alérgica após o contato com o alérgeno.

Figura 3. Em indivíduos pré-dispostos, a exposição inicial ao alérgeno leva à ativação de células específicas para alérgenos T helper 2 (Th2) e síntese de IgE, o que é conhecido como sensibilização alérgica. Exposições subsequentes ao alérgeno causam recrutamento de células inflamatórias e ativação e liberação de mediadores, que são responsáveis pelas respostas alérgicas imediata (EAR) e tardia (LAR). Na EAR, dentro de minutos de contato com o alérgeno, os mastócitos sensibilizados por IgE desgranulam, liberando mediadores nos indivíduos sensibilizados. Estes mediadores incluem histamina, leucotrienos e citocinas, que promovem permeabilidade vascular, contração do músculo liso e produção de muco. Quimiocinas liberadas pelos mastócitos e outros tipos de células promovem recrutamento direto de células inflamatórias que contribuem para a LAR, que é caracterizada pelo influxo de eosinófilos e células Th2. Os eosinófilos liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo cisteinil leucotrienos e proteínas básicas (proteínas catiônicas, peroxidase eosinofílica – EPO e neurotoxina derivada de eosinófilos), que podem ser uma fonte importante de interleucina-3 (IL-3), IL-5, IL-13 e fator estimulador de granulócitos/macrófagos. Neuropeptídeos também parecem contribuir para a fisiopatogenia dos sintomas alérgicos. (Adaptado de Hawrylowicz e O'Garra, 2005).

Como discutido anteriormente, a prevalência de asma tem aumentado principalmente nos países desenvolvidos. Acredita-se que o desenvolvimento de infecção no trato respiratório inferior induzida por bactérias na infância possa proteger contra o desenvolvimento de atopia e asma. Esta linha de pensamento vem da evidência experimental que a exposição a micróbios ajuda a inclinar a resposta imunológica para longe do fenótipo alérgico e em direção à resposta imunológica adulta “normal”, não atópica. Isto levou ao desenvolvimento da “hipótese da higiene”, que sugere que diminuição dos níveis de exposição a estímulos microbianos nos países desenvolvidos, particularmente durante a indução das respostas Th1/Th2 primárias a alérgenos na infância, pode ser responsável pelo aumento da prevalência de asma (Hamid e Tulic, 2009). A figura 4 ilustra os possíveis mecanismos da hipótese da higiene.

Figura 4. O possível mecanismo da hipótese da higiene, onde: Th, célula T helper; Treg, célula T regulatória (Adaptado de Hamid e Tulic, 2009).

1.1.3.1 Citocinas Inflamatórias na Asma

As citocinas são uma família de pequenas proteínas glicosiladas que estão envolvidas em sinalização célula-a-célula, crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose. As ações das citocinas são mediadas por intermédio de receptores específicos de citocinas presentes na superfície das células-alvo. Embora as citocinas normalmente tenham efeito sobre as células adjacentes, elas podem agir à distância e ter efeitos sobre as células que as produzem (Hamid e Tulic, 2009).

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

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

Entretanto, de modo geral, na asma, a inflamação é guiada pela subclasse específica de linfócitos T conhecida como linfócitos Th2, que orquestram e perpetuam a inflamação e o remodelamento, por intermédio da secreção de citocinas específicas, principalmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Renauld, 2001). A figura 5 mostra a resposta imunológica de perfil Th2.

Figura 5. Possíveis efeitos das citocinas Th2 sobre várias células nos pulmões e as potenciais funções das citocinas na asma, onde: MEC, matriz extracelular; IgE, imunoglobulina E (Adaptado de Hamid e Tulic, 2009).

Outras citocinas incluem citocinas pró-inflamatórias [IL-1 β , IL-6, IL-11 e fator de necrose tumoral (TNF)- α], citocinas antiinflamatórias (IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-18), fatores de crescimento [fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF)] e citocinas quimiotáticas ou quimiocinas (RANTES, IL-8) (Hamid e Tulic, 2009). A tabela x mostra algumas das principais citocinas envolvidas na asma e suas funções.

Citocina	Atividade biológica
IFN- γ	Citocina mais importante na imunidade mediada por células; controla o equilíbrio Th1/Th2; inibe a resposta alérgica
IL-10	Antiinflamatória
IL-13	Produção de IgE, inflamação, hipersecreção de muco, eosinofilia
IL-4	Regulação do crescimento, diferenciação, ativação e função de células B
IL-5	Eosinofilia e regulação de eosinófilos
TGF- β	Remodelamento; citocina pró-fibrótica; quimiotática para muitas células inflamatórias

Tabela 1. Principais citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma (Fonte: Hamid e Tulic, 2009).

1.1.3.2 Remodelamento

Durante décadas a asma foi considerada uma condição de obstrução reversível ao fluxo aéreo. Entretanto, muitos pacientes asmáticos apresentam evidências de obstrução residual ao fluxo aéreo, que pode ser detectada mesmo na ausência de sintomas. Entretanto, estas características foram ignoradas durante muito tempo (Vignola et al., 2000). O conceito de remodelamento das vias aéreas na asma foi proposto somente no ano 1992 (Bousquet et al., 1992).

Tecidos e células são normalmente capazes de se adaptarem a lesões e demandas mecânicas e se remodelarem através de mudanças na geometria, estrutura e propriedades. O remodelamento tecidual é a

modificação das propriedades normais do tecido e envolve mudanças na sua composição e organização estrutural (Redington e Howarth, 1997; Halwani et al., 2010). A asma é frequentemente caracterizada por modificações patológicas das estruturais brônquicas das vias aéreas. Estas alterações estruturais são denominadas remodelamento das vias aéreas (Halwani et al., 2010).

Atualmente, sabe-se que muitos indivíduos asmáticos apresentam anormalidades persistentes da função pulmonar, apesar da remissão clínica (Redington e Howarth, 1997). O remodelamento é uma importante característica nas vias aéreas de indivíduos com asma, podendo contribuir em grande proporção para a natureza progressiva da limitação ao fluxo aéreo. Além disso, pode influenciar negativamente a gravidade dos sintomas e a progressão da asma (Postma e Timens, 2006), permitindo também a diferenciação de pacientes com asma grave persistente daqueles com doença moderada (Benayoun et al., 2003).

Na asma, o remodelamento das vias aéreas é classicamente caracterizado como um aumento na espessura da parede brônquica devido a uma variedade de alterações estruturais, incluindo: lesão epitelial (Jeffery et al., 1989), fibrose subepitelial (Roche et al., 1989), aumento na deposição de proteínas na matriz extracelular (Bousquet et al., 1996; Carrol et al., 2000), aumento na massa do músculo liso das vias aéreas (Carrol et al., 1993), angiogênese (Dunnill et al., 1969), desenvolvimento de edema nas vias aéreas e alteração de glândulas mucosas (Sumi e Hamid, 2007). Todos esses processos alteram permanentemente a estrutura das vias aéreas

(Bousquet et al., 2000), resultando em alteração da função das vias aéreas de variadas formas, incluindo maior estreitamento das vias aéreas em resposta a um estímulo broncoconstritor e alteração das forças de recolhimento elástico, levando a ainda mais estreitamento das vias aéreas (Redington e Howarth, 1997).

As várias alterações relacionadas ao remodelamento das vias aéreas e suas características são normalmente demonstradas em humanos por intermédio de estudos que utilizam biópsias (Sumi e Hamid, 2007). Entretanto, estudos observacionais com pacientes asmáticos não permitem determinar os mecanismos responsáveis pelo remodelamento. Para testar hipóteses neste sentido, são utilizados modelos animais da doença. Como os modelos animais combinam a possibilidade de manipulação experimental, são ferramentas integrativas para exploração dos mecanismos moleculares e de novos alvos terapêuticos para a doença humana. Para estes modelos experimentais de remodelamento são utilizadas uma variedade de espécies, incluindo ratos, camundongos, gatos e cobaias (Ramos-Barbón et al., 2004).

Embora seja indiscutível que o remodelamento seja um processo prejudicial conseqüente da asma, acredita-se que ele ocorra na tentativa de proteção dos pulmões. Alguns autores acreditam que sem o remodelamento o paciente seria ainda mais acometido pelos sintomas e função pulmonar anormal (James e Wenzel, 2007).

Segundo Vignola et al. (2003) e James e Wenzel (2007), várias alterações estruturais são responsáveis pelo remodelamento das vias

aéreas de indivíduos asmáticos, todas elas contribuindo para um aumento global na espessura da parede das vias aéreas:

- *Espessamento da membrana basal reticular*: decorrente do aumento da deposição de colágeno tipo I e III, tenascina e fibronectina. Estas proteínas são ativadas pelos miofibroblastos e levam à chamada “fibrose subepitelial”;
- *Matriz extracelular*: alterada pela presença de quantidade anormal de fibras elásticas, fibras colágenas e proteínas. Como as proteínas da matriz extracelular têm diversas funções incluindo integridade estrutural, equilíbrio hídrico, migração celular, agregação de proteínas estruturais, elaboração de fatores de crescimento e proteínas, além de atividade osmótica, sua alteração tem impacto sobre a geometria, a distensibilidade e até mesmo a função das vias aéreas;
- *Vasos sanguíneos*: o remodelamento da parede das vias aéreas está associado a aumento da vascularidade, vasodilatação e insuficiência vascular. A asma está relacionada a aumento do número e tamanho dos vasos brônquicos, incluindo os pequenos vasos sanguíneos da submucosa;
- *Músculo liso*: sofre hipertrofia e hiperplasia, o que leva a aumento do músculo liso das vias aéreas. Além disso, o espessamento do músculo liso pode ocorrer por aumento de matriz extracelular dentro das camadas de músculo liso;
- *Glândulas mucosas*: na asma, o remodelamento das glândulas mucosas é evidenciado pelo aumento em volume e número destas

glândulas, que ficam presentes até mesmo em bronquíolos periféricos, onde normalmente estão ausentes. O acúmulo de muco associado a estas alterações produz estreitamento da luz das vias aéreas. O espessamento da parede das vias aéreas relacionado às alterações de matriz extracelular, músculo liso, epitélio e membrana basal reticular amplifica estes efeitos.

Todas as alterações supracitadas podem contribuir para a hiperresponsividade das vias aéreas e exacerbações observadas na asma (Fahy, 2001; James e Wenzel, 2007; Sumi e Hamid, 2007). Entretanto, o real impacto do remodelamento das vias aéreas sobre a função pulmonar ainda não está completamente elucidado. A figura 6 mostra o mecanismo de hiperresponsividade brônquica baseado no remodelamento.

Figura 6. Mecanismo de hiperresponsividade brônquica baseado no remodelamento das vias aéreas. A inflamação crônica e os mecanismos de reparo contribuem para mudanças estruturais permanentes (lado direito) nas vias aéreas em relação às vias aéreas normais (lado esquerdo). Sob estas condições, a obstrução das vias aéreas ocorre mesmo com o músculo liso intrinsecamente normal. Tais mudanças incluem: (1) aumento do conteúdo de muco; (2) resposta hiperplásica epitelial brônquica; (3) fibrose subepitelial; (4) infiltrado inflamatório persistente; (5) neovascularização; (6) espessamento da camada de músculo liso; (7) espessamento da adventícia das vias aéreas (Adaptado de Ramos-Barbón et al., 2004).

Ainda não existe consenso a respeito da sequência precisa de eventos que ocorrem no processo de remodelamento. Existe controvérsia sobre se os mecanismos inflamatórios levam ao remodelamento das vias aéreas ou se uma alteração intrínseca na parede brônquica é que induz a inflamação crônica (Girodet et al., 2011). Na verdade, estudos recentes têm demonstrado que o remodelamento das vias aéreas pode ser observado desde os estágios iniciais da doença, antedatando os sintomas. Dados sugerem que respostas desreguladas do sistema imunológico são a provável causa primária do remodelamento das vias aéreas. Os mecanismos exatos

vão sendo gradativamente decifrados (Ramos-Barbón et al., 2004; Sumi e Hamid, 2007).

Como o processo de remodelamento ocorre em paralelo, ou talvez seja processo obrigatório, para o estabelecimento da asma persistente, a patogênese do remodelamento das vias aéreas e as implicações de possíveis intervenções terapêuticas que diminuam esta alteração das vias aéreas são importantes áreas de pesquisa (Sumi e Hamid, 2007). Elucidar os mecanismos envolvidos no remodelamento, incluindo a função das células estruturais na asma pode abrir novos horizontes para intervenções terapêuticas mais efetivas (Halwani et al., 2010).

1.1.3.2.1 Mecanismos do Remodelamento das Vias Aéreas

Qualquer processo inflamatório crônico está quase sempre relacionado a um processo de dano tecidual e cicatrização. A cicatrização resulta no reparo e substituição de células mortas ou danificadas por células viáveis. O reparo envolve dois processos distintos: regeneração, que é a substituição das células mortas por outras do mesmo tipo; e substituição, por tecido conectivo. Por isso é que os processos inflamatórios crônicos levam a ampla variedade de consequências, desde restituição completa ou parcial da estrutura acometida até processos de fibrose (Vignola et al., 2000).

O acúmulo de células inflamatórias na mucosa brônquica é uma característica da asma. A infiltração tecidual de células pode envolver tanto o

recrutamento de célula maduras da corrente sanguínea quanto proliferação dos progenitores delas na submucosa. A sobrevivência destas células é influenciada em grande parte pelo micro-ambiente dentro da parede das vias aéreas (Vignola et al., 2000). As células supérfluas ou danificadas são removidas por morte celular programada (ou “apoptose”), que tende a limitar a lesão inflamatória e promover resolução da inflamação (Haslett et al., 1994; Vignola et al., 2000). Entretanto, ao mesmo tempo, como citado anteriormente, estas células também podem persistir e promover a manutenção do infiltrado inflamatório, bem como induzir mudanças permanentes nas vias aéreas (Vignola et al., 2000). Estes processos de lesão e reconstituição podem ocorrer tanto nas vias aéreas proximais quanto distais (Crosby e Waters, 2010).

Diversas células do infiltrado inflamatório estão envolvidas no processo de remodelamento, envolvendo regulação e desregulação da lesão tecidual e processo de reparo (Holgate et al., 1999; Halwani et al., 2010). As células epiteliais brônquicas são uma dessas células que participam ativamente no desenvolvimento da inflamação e remodelamento das vias aéreas na asma (Holgate et al., 1999). O epitélio das vias aéreas representa a interface entre o ambiente externo e o tecido da parede das vias aéreas (Holgate et al., 2008). Assim, estas células participam de uma série de mecanismos de reparo, incluindo epitelização da superfície luminal desnuda, produção de fatores quimiotáticos para células epiteliais, expressão de alguns marcadores de membrana e liberação de amplo espectro de moléculas que participam no reparo das vias aéreas, incluindo fibronectina,

fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Vignola et al., 2000). Os mecanismos de reparação epitelial envolvem interações entre componentes da matriz extracelular, vias de sinalização e componentes estruturais (Crosby e Waters, 2010).

As células dendríticas, que são as células primárias de apresentação ao antígeno, podem conduzir respostas tanto Th1 quanto Th2, dependendo dos fatores co-estimuladores e, portanto, exercem uma função central no direcionamento e consolidação da resposta imunológica nas vias aéreas asmáticas (Kapsenberg et al., 1999).

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

Os fibroblastos participam do processo de remodelamento produzindo fibras colágenas, elásticas e reticulares, bem como proteoglicanos e glicoproteínas da matriz extracelular amorfa (Sheppard e Harrison, 1992). Os mastócitos estão envolvidos na fibrose por estimularem a migração e proliferação de fibroblastos (Ruoss et al., 1991).

As células T participam na fibrose pulmonar por intermédio de seu efeito citotóxico sobre as células pulmonares. Embora ainda seja desconhecido se os linfócitos T possam causar dano direto e remodelamento na asma, sabe-se que estas células contribuem para a patogênese de mudanças estruturais das vias aéreas por orquestrar o recrutamento e a ativação de células inflamatórias (Kay, 1997).

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

Recentemente, as células musculares lisas foram implicadas como células inflamatórias na asma. Estas podem participar da inflamação crônica das vias aéreas por interação com derivados de citocinas Th1 e Th2 para modular atividade quimiotática para eosinófilos, linfócitos T ativados, monócitos e macrófagos, além de terem o potencial de alterar o ambiente da matriz extracelular e orquestrar eventos-chave no processo de remodelamento crônico das vias aéreas (Hirst, 1996).

Por fim, existem proteases e inibidores de proteases envolvidos no processo de remodelamento das vias aéreas. As metaloproteinases (MMPs) degradam seletivamente componentes da matriz extracelular, além de exercerem função crucial no tráfego de células inflamatórias e estruturais. O desequilíbrio entre MMPs e seus inibidores contribuem para o dano tecidual

e algumas das características de remodelamento observadas na asma (Vignola et al., 2003). Existem pelo menos 23 tipos de metaloproteinases implicadas em muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo que na asma as MMPs 2, 8, 9, 12 e inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz (TIMP)-1 são os principais envolvidos (Cataldo et al., 2003).

A MMP-9, proveniente de células inflamatórias e estruturais pulmonares, pode degradar o colágeno, proteoglicanos e elastina, sendo um importante mediador da degradação da matriz extracelular (Vignola et al., 2003; Tang et al., 2005). Com o aumento da MMP-9, há um excesso de seu inibidor TIMP-1, na tentativa do organismo reparar o dano (Tang et al., 2006). O excesso de TIMP-1 sobre a MMP-9 em indivíduos asmáticos pode interferir com o tráfego celular e reparo tecidual, e também pode contribuir para aumento na deposição de matriz extracelular e fibrose pela inibição da MMP-9. Por outro lado, logo após desafio com alérgeno em asmáticos, ocorre aumento na MMP-9, resultando em uma alta proporção MMP-9/TIMP-1, o que sugere que a degeneração da matriz extracelular e da membrana basal pelas MMPs pode ocorrer já na fase inicial da exacerbação da asma, e que a produção de TIMP-1 pode acompanhar ou seguir o aumento da MMP-9 para inibir estes processos (Vignola et al., 2003). Estudos demonstram que a asma está associada a aumento do nível de MMP-9 e TIMP-1 no escarro e lavado broncoalveolar dos indivíduos acometidos (Tang et al., 2006).

A figura 7 mostra uma visão geral da relação entre células inflamatórias e as alterações dos componentes estruturais nas vias aéreas, conhecidos como unidade trófica epitelial-mesenquimal.

Figura 7. Representação esquemática da interação entre células imunológicas, inflamatórias e estruturais na patogênese da asma (Adaptado de Holgate, 2008).

1.1.4 Óxido Nítrico e Estresse Oxidativo

Até a década de 1980, o óxido nítrico (NO) era considerado somente uma molécula tóxica, dentre tantas outras, como fumaça de cigarro e poluição. Era considerado como destruidor da camada de ozônio, provável carcinógeno e precursor da chuva ácida. Somente em 1992 descobriu-se que o NO participa de múltiplas funções biológicas, desde digestão e regulação da pressão sanguínea até contra microorganismos (Culotta e Koshland Jr, 1992). A partir destas descobertas, a presença de óxido nítrico

no ar exalado começou a ser estudada como ferramenta de avaliação de diversas doenças pulmonares, principalmente a asma (Pendharkar e Mehta, 2008).

Óxido nítrico é considerado uma parte essencial de diversos processos fisiológicos, tais como relaxamento da musculatura lisa, agregação de plaquetas, neurotransmissão (é um neurotransmissor do sistema não-adrenérgico não-colinérgico; NANC), regulação imunológica, defesa e inflamação (Zoritch, 1995; Chapman et al., 2001; Ricciardolo et al., 2004). Nas vias aéreas, o NO exerce múltiplas funções, variando de modulador endógeno da função das vias aéreas a medidor pró-inflamatório e imunomodulador em condições patológicas (Ricciardolo, 2003). Sabe-se que o NO interfere em doenças de vias aéreas, hipertensão pulmonar, lesão pulmonar e infecção (Rodway et al., 2009).

O óxido nítrico é uma molécula de gás altamente reativa. É um radical livre que reage com outras moléculas como o oxigênio, radicais superóxido ou metais de transição (como aqueles encontrados dentro de hemoproteínas). As óxido nítrico sintases (NOS) são as enzimas responsáveis por catalisar a formação de óxido nítrico através da conversão enzimática do aminoácido arginina em citrulina (Kharitonov et al., 1995; Chapman et al., 2001).

O NO é endogenamente sintetizado por uma de três isoformas de NOS, com diferentes atividades, sendo duas constitutivas (eNOS, derivada do endotélio; e nNOS, derivada dos neurônios) e uma NOS induzida (iNOS) (Chapman et al., 2001; Grob e Dweik, 2008; Rodway et al., 2009). Agonistas

ativam as NOS constitutivas (cNOS) por aumento na concentração de cálcio resultando em liberação de NO em segundos. A iNOS é parte do sistema imunológico e é induzida por citocinas, endotoxina e lipopolisacarídeos, resultando em formação de grandes quantidades de NO. Esta reação pode ser bloqueada por glucocorticosteróides (Zoritch, 1995).

No trato respiratório o NO é produzido por uma ampla variedade de células, incluindo células epiteliais, nervos, células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos) e células endoteliais vasculares (Ricciardolo et al., 2003). Uma vez produzido, o NO difunde-se rapidamente do local de síntese, permeando membranas celulares, e interage com os sítios moleculares intracelulares (Ricciardolo, 2003).

As isoformas constitutivas estão envolvidas na vasodilatação e broncodilatação. A iNOS é estimulada por muitas citocinas pró-inflamatórias e é expressa em alguns tipos de células inflamatórias (Ricciardolo et al., 2004). A figura 8 mostra a formação do NO através das diferentes NOS.

Figura 8. (A) cNOS é ativada pelo aumento no cálcio (Ca^{2+}) em resposta à ativação a um receptor de superfície. (B) iNOS é induzida por citocinas ou lipossacarídeos, resultando em maiores quantidades de formação de NO (Adaptado de Zoritch, 1995).

Já foi demonstrado, em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica, que a inibição não específica da produção de NO potencializa a broncoconstrição e o remodelamento das vias aéreas. Por outro lado, o bloqueio do NO derivado somente da iNOS atenua a constrição das vias aéreas, a inflamação e os processos de remodelamento, sugerindo um efeito pró-inflamatório da iNOS e possíveis efeitos protetores das NOS constitutivas (Prado et al., 2006). Então, a deficiência de NO derivado das cNOS é a principal determinante da hiperresponsividade das vias aéreas (Boer et al., 2001).

No sistema respiratório, o NO produz efeitos reguladores, protetores e deletérios. Como regulador, o NO controla a circulação traqueobrônquica, suprime a exsudação de plasma nas vias aéreas e estimula o clearance mucociliar, um mecanismo primário de defesa das vias aéreas. Como agente citoprotetor, o NO é conhecido por atenuar a toxicidade mediada de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido. O aumento da atividade da iNOS eleva a produção de NO e cria um ambiente tóxico para vírus, bactérias, fungos e parasitas. Esta atividade da iNOS no epitélio das vias aéreas é importante para a defesa das mesmas (Rodway et al., 2009).

Embora o NO por si mesmo não seja inerentemente citotóxico, ele pode agir como um agente citotóxico ou citoprotetor, dependendo das condições intracelulares. A reação do NO com radicais livres como o oxigênio produz compostos reativos nitrogenados que exercem funções

fisiológicas e são importantes para a destruição de microorganismos (Ricciardolo et al., 2004; Rodway et al., 2009).

Como a asma está associada a aumento na concentração de óxido nítrico, há conseqüente excesso de produção de compostos reativos nitrogenados, o que pode causar efeitos deletérios. O peroxinitrito (ONOO^-), um dos potentes oxidantes formados pela reação entre NO e oxigênio é responsável por inibir a função enzimática, causar danos em ácido desoxirribonucléico (ADN), induzir peroxidação lipídica e aumentar a susceptibilidade celular à radiação, metais tóxicos e agentes quimioterápicos (Rodway et al., 2009). Estas alterações são conhecidas como estresse oxidativo e são responsáveis por modificações na função celular e potencialização das respostas inflamatórias (Ricciardolo et al., 2004). Assim, o estresse oxidativo é um importante fator para a amplificação da inflamação das vias aéreas na asma (Shiraki et al., 2008).

O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (Morrow, 2006).

Os isoprostanos participam de diferentes funções biológicas e são responsáveis pela mediação de certos aspectos da lesão oxidativa (Milne et al., 2008). Os isoprostanos são produzidos via peroxidação do ácido araquidônico, em uma reação catalisada por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Lawson et al., 1999). Estes componentes são úteis biomarcadores para o estresse oxidativo, estando os isoprostanos

aumentados nos níveis séricos, urina, ar exalado e fluido do lavado broncoalveolar (Montuschi et al., 1999).

A via de formação dos isoprostanos tem capacidade para produzir 64 estruturas isoméricas, das quais o 8-iso-PGF₂ α é o melhor caracterizado (Lawson et al., 1999). O 8-iso-PGF₂ α é um isômero de PGF₂ α com efeitos contráteis através de ligação a receptores tromboxane A₂ no músculo liso das vias aéreas (Janssen et al., 2000). Além disso, este agente causa aumento da resistência pulmonar, indicando que o 8-iso-PGF₂ α , via estresse oxidativo, pode ser um dos mediadores da limitação ao fluxo aéreo na asma, embora outros mediadores também exerçam esta função (Shiraki et al., 2008).

1.1.5 Modelos Experimentais de Asma

Primeiramente, deve ser colocado que não há um verdadeiro “modelo de asma”, uma vez que as complexidades da doença humana não são reprodutíveis em nenhum animal (Vargaftig, 1999). Não se conhece nenhum animal de laboratório que desenvolva espontaneamente uma doença com características que possam ser consideradas como sendo asma (Szelenyi, 2002). O que existem são modelos de inflamação alérgica, de respostas imediatas e/ou tardias, entre outros. Estes modelos, quando associados no mesmo animal e em cronologia adequada, constituem uma representação limitada de características da doença (Vargaftig, 1999).

Há alguns exemplos no mundo animal que são semelhantes à asma: gatos podem desenvolver uma doença brônquica semelhante à asma crônica (Padrid, 1992); cavalos podem desenvolver uma doença das vias aéreas dominada por neutrófilos conhecida como tendo algumas das características da asma (Herzberg et al., 2006); e tanto ovelhas quanto cães parecem ter suscetibilidade natural a alguns alérgenos (Abraham, 1995; de Weck et al., 1997). Entretanto, nenhum destes modelos animais exibe a resposta inflamatória altamente localizada e crônica ou as lesões patológicas específicas que caracterizam a asma, nem parecem produzir o mesmo grau de responsividade inespecífica como a doença humana (Bile e Green, 2000). Portanto, a principal desvantagem relacionada ao uso de modelos experimentais é a existência de importantes diferenças entre a espécie humana e os animais utilizados (Gimeno, 2003).

Obviamente, em condições ideais, a fim de se evoluir com o conhecimento sobre os mecanismos da asma, para então tentar novas terapias, estudos aprofundados deveriam ser conduzidos em humanos asmáticos. Entretanto, por questões éticas óbvias, os tipos de experimentos necessários para avaliar cuidadosamente tais mecanismos envolvidos em níveis celulares e moleculares limitam muitos estudos em humanos. São devido a estas limitações éticas e logísticas com seres humanos que são desenvolvidos os modelos experimentais (Zosky e Sly, 2007; Shin et al., 2009). Assim, embora não exista modelo ideal de asma humana, é necessário seguir com a realização de experimentos em modelos animais que mimetizem as diversas manifestações do estado asmático humano

(Gimeno, 2003), levando-se em consideração que a correlação entre os processos observados nos modelos e nos seres humanos deve ser cuidadosamente considerada (Zosky e Sly, 2007).

De qualquer forma, os modelos experimentais têm sido aperfeiçoados. Para serem adequados no estudo da asma, os modelos animais devem contemplar reatividade das vias aéreas, produção de IgE, perfil de citocinas, resposta imunológica e remodelamento (Bile e Green, 2000).

Os modelos animais são particularmente úteis para estudos mecanísticos que, uma vez identificados, podem ser manipulados para avaliação da sua função e importância nas anormalidades características da asma, tais como inflamação, remodelamento e limitação ao fluxo aéreo. Este mesmo princípio pode ser aplicado à descoberta e desenvolvimento de novas drogas (Zosky e Sly, 2007).

Segundo Gimeno (2003), o uso de modelos experimentais apresenta as seguintes vantagens:

- Possibilidade de manipulação e controle de influências ambientais e genéticas;
- Possibilidade de correlacionar a disfunção das vias aéreas à existência de mudanças morfológicas e inflamatórias;
- Disponibilidade de manipular o modelo experimental, estabelecendo relação direta entre causa e efeito.

Obviamente, segundo Zozky e Sly (2007), assim como os modelos animais são vantajosos, também apresentam alguns problemas, incluindo:

- Impossibilidade de extrapolação dos resultados diretamente para seres humanos: como a asma não é uma condição presente naturalmente em animais, é necessário induzir uma reação asmática artificial nas vias aéreas. Além disso, existem vários modelos animais disponíveis na literatura com um comensurável número de métodos para indução das reações “asmáticas”, o que gera impacto nos resultados e dificulta a comparação entre os estudos;
- Uso de adjuvantes: a necessidade de adjuvantes, como o alúmen, pode alterar o mecanismo de sensibilização a um alérgeno e o modo como o sistema imunológico tenha sido preparado pode afastar o modelo animal da condição humana. Foi para remover o adjuvante como variável que surgiram os modelos que não necessitam do uso de adjuvantes.
- Cronicidade: muitos modelos são de fato modelos de resposta inflamatória aguda nas vias aéreas, o que destoa da asma por esta ser uma doença crônica caracterizada por remodelamento;
- Anatomia: as espécies diferem anatomicamente entre si. Uma das diferenças óbvias entre seres humanos e os modelos animais de asma é o fato que todos os modelos animais

usados são quadrúpedes. Embora pareça ser uma diferença inconseqüente, a postura pode ter impacto significativo nas forças que agem sobre os pulmões, devido aos efeitos da gravidade e parede torácica, o que pode influenciar na forma como o pulmão responde à limitação ao fluxo.

Poder-se-ia sugerir que o uso de animais de grande porte, incluindo cães e primatas, garantiria respostas mais semelhantes àsquelas da espécie humana. Entretanto, são inconvenientes destes tipos de animais a dificuldade no uso de novas tecnologias (biologia celular e molecular, genética), dificuldade de armazenamento e altos custos (Gimeno, 2003).

A variedade de modelos animais de asma é ampla e envolve diferentes espécies. Camundongos, ratos, cobaias, cães, ovelhas macacos e cavalos têm sido utilizados no estudo de processos inflamatórios e alterações na função das vias aéreas. Individualmente, cada um destes animais também possui certas vantagens e desvantagens como um modelo de inflamação alérgica das vias aéreas, como demonstrado na tabela 2 (Shin et al., 2009).

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

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

Segundo Gimeno (2003), pequenas espécies, como as cobaias, têm sido os animais mais utilizados na última década. As razões para esta preferência incluem:

- Melhor oferta de recursos técnicos;
- Disponibilidade de equipamentos para avaliação funcional;
- Sistema imunológico bem definido;

- Possibilidade de uso de animais com depleção de elementos celulares, transgênicos (*knock-out*) ou com superexposição de genes específicos;
- Ciclo reprodutivo curto;
- Vantagens econômicas para compra e manutenção.

A interpretação dos resultados dos modelos experimentais e a extrapolação destes resultados para humanos asmáticos também são altamente dependentes da espécie de animal escolhida (Zosky e Sly, 2007).

Cobaias sensibilizadas com ovoalbumina e então desafiadas com aerossol do antígeno são frequentemente usadas como modelo animal para avaliação da função pulmonar e infiltração celular (Smith et al., 2007). Estes animais, quando sensibilizados com ovoalbumina, apresentam eosinofilia e hiperresponsividade das vias aéreas (Sanjar et al., 1990). As respostas alérgicas nestes animais são causadas por muitos peptídeos, citocinas e quimiocinas com homologia às respostas dos humanos (Bile e Green, 2000).

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

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

Entretanto, o surgimento de camundongos transgênicos resultou e continua resultando na redução do uso de cobaias para modelos de doenças de vias aéreas. Isto é lamentável, uma vez que muitas características das cobaias são superiores às de camundongos para estudos de processos relacionados à asma (Canning et al., 2008). Modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica já demonstraram ser capazes de reproduzir características relacionadas ao processo inflamatório, reatividade de vias aéreas, estresse oxidativo e remodelamento de matriz extracelular (Tibério et al., 1997; Prado et al., 2006; Ruiz-Schütz et al., 2009; Prado et al., 2011).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico de asma é baseado em aspectos clínicos e testes diagnósticos específicos (Bateman et al., 2008; GINA, 2010). O diagnóstico correto deve levar em consideração as manifestações clínicas das doenças

das vias aéreas, que incluem algumas respostas fisiológicas gerais: hiperresponsividade das vias aéreas, bronquite, hipersensibilidade do reflexo de tosse, dano às vias aéreas e pulmões, e condições extra-pulmonares tais como descondicionamento, rinite e obesidade (Pavord, 2009).

O diagnóstico clínico é obtido por intermédio da história médica do indivíduo, na qual a presença de sintomas como dispnéia episódica, sibilos, tosse e tiragem intercostal são indícios da presença da doença (Levy et al., 2006). Além disso, sintomas episódicos após exposição acidental a alérgenos, variabilidade sazonal dos sintomas e história familiar da doença são sinais diagnósticos úteis. Ao exame físico, presença de sibilos à ausculta confirma existência de limitação ao fluxo aéreo (Bateman et al., 2008).

Dentre os testes diagnósticos para confirmação da asma, podem ser incluídas as medidas de função pulmonar (que confirmam a limitação ao fluxo aéreo, e particularmente demonstram a reversibilidade das anormalidades de função pulmonar), medidas de hiperresponsividade de vias aéreas (usam a responsividade das vias aéreas a exercícios e drogas como metacolina, histamina e manitol para pacientes com sintomas consistentes com asma, porém com função pulmonar normal) e medidas de condição alérgica (devido à forte associação entre asma e doenças alérgicas, a presença de alergias pode ajudar a identificação de fatores de risco que causam sintomas de asma em um determinado paciente (Bateman et al., 2008)).

As medidas de função pulmonar são as mais importantes, sendo que a manobra expiratória forçada é essencial. O grau de reversibilidade no volume expiratório forçado em um segundo (VEF_1) que indica um diagnóstico de asma é geralmente aceito como $\geq 12\%$ e ≥ 200 mL em relação ao valor pré-brcodilatador. Entretanto, como muitas doenças podem acarretar em redução de VEF_1 , uma avaliação útil da limitação ao fluxo aéreo é a proporção da VEF_1 em relação à capacidade vital forçada (CVF). Valores menores que 0,75-080 de relação VEF_1 /CVF indicam limitação ao fluxo aéreo (Pellegrino et al., 2005).

Medidas de pico de fluxo expiratório (PFE) utilizando-se de um medidor de pico de fluxo também são importantes para o diagnóstico e monitoramento da asma. Entretanto, como estas medidas não são comparáveis com outras medidas de função pulmonar, como a VEF_1 , porque os valores obtidos com diferentes medidores de pico de fluxo variam muito, elas são apenas úteis para comparação com as melhores medidas do próprio indivíduo usando seu próprio medidor de fluxo (Bateman et al., 2008).

O desafio com drogas como a metacolina também é altamente sensível e tem grande valor preditivo. Um desafio com metacolina negativo exclui asma em curso com razoável certeza (Cockcroft, 2010). Testes indiretos para liberação de mediadores endógenos causadores de contração da musculatura lisa das vias aéreas e desencadeamento de hiperresponsividade, incluindo estímulo com exercício físico, também são apropriados (Anderson, 2010).

Além das ferramentas diagnósticas acima descritas, os biomarcadores incluindo escarro induzido e a concentração fracionária de óxido nítrico exalado (FE_{NO}) também são importantes para a avaliação da asma. A análise do escarro induzido permite avaliação da inflamação eosinofílica das vias aéreas; as medidas de FE_{NO} também fornecem informações sobre a inflamação subjacente das vias aéreas (Reddel et al., 2009).

De modo geral, o risco de exacerbações futuras de asma pode ser controlado de três maneiras. Primeiramente, é necessário identificar fatores epidemiológicos que caracterizem “risco” para o paciente, tais como sexo masculino, etnia e história de tabagismo. Segundo, há a história individual do paciente. O passado é bom preditivo do futuro. Terceiro e por fim, há os parâmetros fisiopatológicos que podem ser usados como prognóstico (Taylor, 2010).

1.1.6.1 NO_{EX} no Diagnóstico e Controle da Asma

O advento de analisadores por quimioluminiscência na década de 1990 permitiu a detecção de pequenos níveis (partes por bilhão; ppb) de NO no ar exalado (Grob e Dweik, 2008).

O ar exalado de crianças e adultos com asma apresentam aumento do nível de NO, quando comparado a controles saudáveis. Níveis mais altos de NO exalado também são encontrados nos indivíduos alérgicos em

relação aos não alérgicos (Sachs-Olsen et al., 2010). A relação entre inflamação alérgica das vias aéreas e aumento de óxido nítrico no ar exalado também está bem estabelecida em modelos animais (Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2005; Ruiz-Schütz et al., 2009). Além disso, existem evidências que o aumento de liberação de NO não ocorre somente nas vias aéreas proximais; acredita-se que haja também aumento da concentração de NO alveolar na asma, uma vez que é uma doença que também envolve inflamação de pequenas vias aéreas e alvéolos, o que contribui para o desenvolvimento de obstrução periférica (Kelly, 2010; Matsumoto et al., 2010), embora existam dados que sugerem que a concentração de NO periférica possa ser normal em indivíduos com asma (Gelb et al., 2010).

Com base nas evidências de associação entre asma e o aumento do NO exalado, o nível de óxido nítrico no ar exalado (NO_{EX}) surgiu como um método não invasivo potencial para auxiliar no diagnóstico de asma e monitorar a resposta à terapia antiinflamatória (Grob e Dweik, 2008; Pavord e Martin, 2009; Pendharkar e Mehta, 2008). Estratégias para alcançar o controle da doença são fundamentais para promover manutenção da função pulmonar normal e os níveis de atividade (Rodway et al., 2009).

Embora a relação entre NO_{EX} e a inflamação subjacente na asma seja indireta e complexa, o nível de NO exalado parece estar relacionado a diferentes características da asma, incluindo inflamação eosinofílica (Pavord e Martin, 2009; Amirav e Zacharasiewicz, 2008; Pendharkar e Mehta, 2008; Taylor, 2010) e atopia (Dweik et al., 2001; Pendharkar e Mehta, 2008). A

terapia antiinflamatória com corticosteróides está consistentemente associada com redução dos níveis de NO exalado, tanto na asma estável quanto nas exacerbações (Pavord e Martin, 2009; Pendharkar e Mehta, 2008).

Além de auxiliar no diagnóstico da asma, a mensuração dos níveis de NO exalado pode ser utilizado como ferramenta para monitoramento do controle da doença (Pavord e Martin, 2009; Pendharkar e Mehta, 2008). Como na tentativa de controle da asma há o risco de utilizar muito ou pouco tratamento, a comunidade científica busca por um biomarcador simples, fácil de ser usado e fidedigno, e que auxilie no correto aumento ou redução do tratamento. Neste contexto é que o NO exalado, considerado marcador indireto da inflamação das vias aéreas, tem gerado muito entusiasmo (Pedersen e O'Byrne, 2008).

Por exemplo, medir os níveis de NO exalado pode guiar o início, otimização e/ou interrupção de terapia com corticosteróides sem comprometimento do controle da doença, uma vez que os níveis de NO respondem paralelamente às modificações da terapia com antiinflamatórios (Pavord e Martin, 2009; Amirav e Zacharasiewicz, 2008; Pendharkar e Mehta, 2008). Acredita-se que $NO_{EX} < 25ppb$ está fortemente associada com redução ou descontinuação bem-sucedida dos corticosteróides (Pavord, 2009).

Outras vantagens que contribuem para a utilidade da mensuração do NO exalado na prática clínica, além de sua próxima relação com a inflamação eosinofílica nas vias aéreas, é sua facilidade de mensuração,

disponibilidade de monitores econômicos e o fornecimento de resultados imediatos, possibilitando a avaliação próxima ao paciente (Pavord e Martin, 2009).

Entretanto, existem alguns pontos negativos para o uso de NOex, incluindo a dificuldade em estabelecer “valores de referência”, uma vez que valores derivados da população “normal” podem não ser aplicáveis a indivíduos asmáticos. Além disso, existem possíveis fatores de confusão que afetam os níveis de NOex, tais como idade, gênero, peso, altura e consumo de alimentos (Grob e Dweik, 2008).

1.1.7 Tratamento

O tratamento da asma deve ter os seguintes objetivos: 1) alcançar e manter o controle dos sintomas; 2) manter níveis normais de atividade, incluindo exercícios; 3) manter função pulmonar o mais próxima possível do normal; 4) prevenir exacerbações da doença; 5) evitar efeitos adversos das medicações; e 6) prevenir mortalidade (Bateman et al., 2008).

De modo geral, a intervenção farmacológica na asma depende do nível de controle clínico do paciente (GINA, 2010). Para a maioria dos pacientes asmáticos, terapias com broncodilatadores e antiinflamatórios são extremamente eficazes para o tratamento da doença (Fernandes et al., 2007). Atualmente, as medicações antiinflamatórias mais eficazes para o tratamento da asma são os corticosteróides, que mostram eficácia em

reduzir os sintomas da asma, melhorar a qualidade de vida, melhorar a função pulmonar, reduzir a hiperresponsividade das vias aéreas, controlar a inflamação das vias aéreas, reduzir a frequência e a gravidade das exacerbações, e reduzir a mortalidade por asma. Entretanto, estes não curam a asma e, se descontinuados, a deterioração clínica logo ocorre (Bateman et al., 2008). Além disso, são relativamente menos eficazes no tratamento de asma persistente grave (Ito et al., 2006), têm pouco efeito sobre o remodelamento (Buc et al., 2009) e, em altas doses, causam efeitos adversos, embora paradoxalmente a hiperresponsividade ao estímulo direto continue existindo (Brannan, 2010).

Outras terapias usadas no tratamento da asma incluem moduladores de leucotrienos, que apresentam propriedades antiinflamatórias e são eficazes para a resposta asmática precoce e tardia, e agentes anticolinérgicos (Dykewicz, 2001; Perry et al., 2004).

Uma opção farmacológica alternativa para os casos nos quais mesmo altas doses de corticosteróides inaláveis e/ou corticosteróides orais de longo prazo são insuficientes é a imunoterapia, um tratamento com anticorpo recombinante anti-imunoglobulina E. Entretanto, sua indicação é normalmente limitada a indivíduos com asma alérgica grave e níveis séricos elevados de IgE. Além disso, esta forma de terapia também pode falhar no controle da doença de alguns asmáticos (Humbert et al., 2005; Girodet et al., 2011).

Portanto, a busca por novas terapias eficazes para o tratamento da asma se faz necessária principalmente para aqueles indivíduos asmáticos

cujos sintomas não são bem controlados pelas medicações disponíveis atualmente (Fernandes et al., 2007). Uma das drogas com potencial para esse tipo de tratamento são os inibidores de Rho quinase (ROK), assunto a ser abordado adiante.

Quando possível, as drogas usadas para o tratamento da asma são administradas por inalação, para assegurar a liberação ótima do medicamento nas vias aéreas e minimizar a exposição sistêmica e os efeitos adversos associados (Fernandes et al., 2007).

Além do uso de medicações específicas, o tratamento da asma depende de educação do paciente quanto à doença, bem como identificar e reduzir a exposição aos fatores de risco (Bateman et al., 2008).

1.2 Rho Quinase

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

A Rho quinase exerce múltiplas funções celulares e biológicas, sendo que a via Rho-Rho quinase está envolvida em ampla variedade de doenças associadas com aumento de tônus da musculatura lisa ou com hiperreatividade do músculo liso. Além disso, esta via também participa de processos patológicos envolvendo muitas células não musculares (Wettschureck e Offermanns, 2002).

A atividade da Rho é regulada por três grupos de proteínas: proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que facilitam a inativação da forma GTP ativa pelo aumento da atividade intrínseca da GTPase na Rho; inibidores de dissociação de GTPase (GDIs), que inibem algumas GTPases da família Rho por ligação a membranas e previnem a dissociação e, portanto a ativação de nucleotídeos; e fatores de troca guanina nucleotídeo específico para Rho (Rho GEFs), que facilitam a ativação da Rho por promover a dissociação de GDP e subsequentemente ligação de GTP. As Rho GEFs são consideradas os principais reguladores da atividade da Rho. A atividade da Rho também pode ser regulada por numerosos receptores de proteína G (Wettschureck e Offermanns, 2002; Schaafsma et al., 2008b). Além disso, a ativação da Rho é fortemente dependente de sua modificação pós-translacional (isoprenilação) mediada através da atividade de geranilgeraniltransferase (Casey, 1995).

O Fasudil é o único inibidor da Rho quinase utilizado clinicamente, e foi aprovado no Japão em 1995 para o tratamento de vasoespasma após hemorragia subaracnóidea (Mong e Wong, 2009).

1.2.1 Propriedades Farmacológicas de Inibidores da Rho quinase

Os inibidores farmacológicos da Rho quinase ajudam a estabelecer as atividades desta proteína. Os principais inibidores da Rho quinase incluem:

- Y-27632 ([(+)-(R)-*trans*-4-(1-Aminoetil)-N-(4-piridil) cicloexano-carboxamida dihidrocloro]): é comumente usado como inibidor da Rho quinase. O Y-27632 (figura 9) é permeável na célula e compete com o local de ligação de ATP na Rho quinase, inibindo as atividades da ROCK1 e ROCK2 (Darenfed et al., 2007; Schaafsma et al., 2008b). Alguns análogos de Y-27632 já foram sintetizados, tais como o Y-30141 e o Y-30694, mas seus efeitos são ligeiramente diferentes do Y-27632 (Uehata et al., 1997). Devido a seus importantes efeitos sobre a Rho quinase, o Y-27632 tem sido considerado como um agente terapêutico potencial (Darenfed et al., 2007).

Figura 9. Estrutura do inibidor específico da Rho quinase, Y-2732 (Adaptado de Yamaguchi et al., 2006).

- Fasudil ou HA-1077 [1-(5-isoquinolina-sulfonil)-homo-piperazina]: tem afinidade pela Rho quinase semelhante ao Y-27632, porém com menor seletividade (Schaafsma et al., 2008b). Apesar disso, é frequentemente usado em modelos animais e atualmente é o único inibidor de Rho quinase disponível para uso clínico. O Fasudil foi aprovado no Japão em 1995 para prevenção de vasoespasma em pacientes com hemorragia subaracnóidea (Hirooka e Shimokawa, 2005; Mong e Wong, 2009).
- Inibidores da Rho quinase baseados em aminofurazam e azaindole: são mais potentes em inibir a ROCK1. Ainda não foram estudados no contexto das doenças das vias aéreas (Schaafsma et al., 2008b).

1.2.2 Asma e Hiperresponsividade das vias Aéreas

Conforme descrito anteriormente, a asma é uma doença inflamatória caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas (HRVA) a uma variedade de estímulos (Cockcroft et al., 1988; Durham et al., 1988; Hargreave et al., 1985). O estreitamento das vias aéreas em resposta a um estímulo inespecífico é uma característica de todas as doenças obstrutivas humanas, incluindo a asma (Chiba e Misawa, 2004; Chiba et al., 2010). Assim como as vias aéreas, na asma, os vasos pulmonares também apresentam hiperresponsividade a diferentes agonistas vasoconstritores (Witzenrath et al., 2006).

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

Diversos mecanismos já foram sugeridos como causadores da hiperresponsividade das vias aéreas, tais como alterações no controle neural do músculo liso das vias aéreas (Boushey et al., 1980) e fatores mecânicos relacionado ao remodelamento das vias aéreas (Wiggs et al., 1990). É útil dividir os fatores que contribuem para a hiperresponsividade das vias aéreas em duas categorias: “persistente” e “variável” (figura 10), embora estes processos estejam inter-relacionados e sejam interdependentes. Os aspectos persistentes da hiperresponsividade das vias aéreas são atribuídos às mudanças estruturais das mesmas, incluindo o espessamento subendotelial, hipertrofia da musculatura lisa, deposição de matriz e alteração dos elementos vasculares. O outro componente da hiperresponsividade das vias aéreas, o aspecto variável, parece estar relacionado aos eventos inflamatórios nas vias aéreas, que são variáveis e influenciados por vários eventos ambientais, tais como alérgenos, infecções respiratórias e tratamentos (Busse, 2010).

Figura 10. Hiperresponsividade das vias aéreas. A) Componentes das mudanças das vias aéreas na asma que contribuem para a hiperresponsividade; B) Fatores que afetam os componentes variável e persistente da hiperresponsividade das vias aéreas (Adaptado de Busse et al., 2010).

Entretanto, embora a HRVA seja um importante sinal da doença, as alterações fisiopatológicas responsáveis pela hiperresponsividade ainda não foram completamente elucidadas (Chiba et al., 2010). Atualmente, um dos principais fatores relacionados ao exagerado estreitamento das vias aéreas na asma é a anormalidade das propriedades do músculo liso das vias aéreas (Chiba et al., 2010; Martin et al., 2000), incluindo a sensibilização do cálcio (Ca^{2+}) mediada por agonistas (Chiba et al., 2010).

O tônus das vias aéreas pode ser elevado por liberação de neurotransmissores (acetilcolina, neuropeptídeos) ou por mediadores liberados de células inflamatórias residentes ou infiltradas (p. ex. histamina, cisteinil leucotrienos e endotelina-1). Cada um destes agentes broncoconstritores exerce suas ações via estimulação de receptores específicos de proteína G localizados na superfície das células do músculo liso das vias aéreas. A estimulação destes receptores pode ocorrer por

aumento na concentração de cálcio livre ou por ativação da Rho quinase (Henry et al., 2005). Estes mecanismos serão descritos a seguir.

1.2.3 Contração Fisiológica do Músculo Liso

A contração do músculo liso induzida por agonistas é uma das características da asma, contribuindo para a resistência ao fluxo aéreo. O tônus da musculatura lisa é primariamente regulado pelo nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) tanto por mecanismos dependentes quanto independentes de Ca^{2+} . Um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , via ativação de canais de cálcio na membrana plasmática e/ou liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, leva à formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, resultando na ativação da miosinoquinase. Esta enzima fosforila a CLM, resultando em contração da musculatura lisa por ligação entre a actina e a miosina (Schaafsma et al., 2006; Chiba e Misawa, 2004; Hashimoto et al., 2002b; Kamm et al., 1985; Chiba et al., 2010). Como os filamentos de actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e membrana plasmática por estruturas conhecidas como corpos densos e placas densas, o miócito contrai (Sylvester, 2004). A extensão da contração é determinada pelo equilíbrio da atividade entre a miosinoquinase e a miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006; Somlyo et al., 2003).

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

Os mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que uma das principais vias envolvidas neste processo é a via Rho/Rho quinase (Schaafsma et al., 2006; Hashimoto et al., 2002b; Hirata et al., 1991; Kureishi et al., 1977; Chiba et al., 2010). A Rho quinase é uma proteína quinase conhecida como sendo um dos principais efetores da Rho, uma pequena GTPase monomérica envolvida na sinalização de uma ampla variedade de funções celulares, incluindo migração, fagocitose, proliferação, secreção e manutenção da forma celular (Sylvester, 2004).

A Rho quinase ativada interfere com o equilíbrio entre as atividades da miosinoquinase e a miosinofosfatase, fosforilando e consequentemente

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

Portanto, espera-se que o bloqueio da atuação da Rho quinase possa atenuar as respostas contráteis via inibição do mecanismo de sensibilização do Ca^{2+} (Hashimoto et al., 2002b). O uso de inibidores da Rho quinase bloquearia sua atividade competindo com o local de ligação do ATP na enzima e preveniria a inibição da miosinofosfatase mediada pela Rho, resultando em relaxamento da musculatura lisa (Uehata et al., 1997; Nagumo et al., 2000; Chiba et al., 2010). A figura 11 mostra a representação esquemática da função da via Rho/Rho quinase na contração do músculo liso.

Figura 11. Representação diagramática da função da via Rho/Rho quinase na contração da musculatura lisa das vias aéreas. Abreviações: ROK, Rho quinase; GEF, fatores de troca guanina nucleotídeo; GAP, proteínas de ativação de GTPase; PLC, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; CLM, cadeia leve da miosina; MQ, miosinoquinase; MF, miosinofosfatase; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; IP3, inositol [1,4,5]-trifosfato; CaM, calmodulina; RS, retículo sarcoplasmático (Adaptado de Fernandes et al., 2009).

1.2.4 Sensibilização do Ca^{2+} mediada pela Rho quinase em músculos lisos alterados

Estudos experimentais recentes têm demonstrado que o Y-27632, um inibidor altamente seletivo da Rho quinase (Kimura et al., 1996; Aihara et al., 2003), é útil em demonstrar o aumento da sensibilização do cálcio mediada pela via Rho/Rho quinase na contração do músculo liso (Chiba et al., 2010).

Uehata et al. (1997) originalmente demonstraram o envolvimento da via Rho quinase na patogênese da hipertensão. Os autores mostraram que o uso de Y-27632 reduziu a pressão sanguínea de ratos hipertensivos, mas não a pressão sanguínea normal de animais normotensos (Uehata et al., 1997). Outros autores também demonstraram aumento da ativação da Rho quinase no músculo liso vascular de vários modelos de hipertensão (Seko et al. 2003, Nakahata et al., 2000; Kureishi et al., 1997).

A ativação exagerada da via Rho/Rho quinase também participa da patogenia da hipertensão pulmonar. A ativação anormalmente aumentada da via Rho/Rho quinase está implicada em múltiplos componentes responsáveis pela doença, tanto no músculo liso quanto no endotélio, incluindo a constrição, proliferação e migração celular, além de inibição da apoptose de miócitos (Connolly e Aaronson, 2010).

O sistema Rho/Rho quinase também atua no vasoespasma cerebral. O vasoespasma cerebral experimental induzido por hemorragia subaracnóidea foi acompanhada por elevada atividade da Rho quinase e fosforilação da miosina fosfatase e sua subunidade de ligação na miosina (Sato et al., 2000). Todos estes achados incluem a via Rho/Rho quinase como uma possível chave para a compreensão da contração anormal dos músculos lisos vasculares alterados (Chiba et al., 2010).

Anormalidades do sistema Rho/Rho quinase também parecem estar relacionadas ao trabalho de parto prematuro e disfunção erétil. No útero gravídico de animais experimentais, a via Rho/Rho quinase tem mostrado aumentar a contratilidade do músculo liso do miométrio (Niiró et al., 1997;

Cario-Toumaniantz et al., 2003). A sensibilização do Ca^{2+} mediada pela via Rho/Rho quinase parece também estar relacionada à manutenção do estado flácido (contração) do pênis, uma vez que o uso de Y-27632 aumenta a pressão do corpo cavernoso, responsável pela ereção do pênis (Chitale et al., 2001). Por estas razões, a via da Rho quinase também tem sido investigada como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas para tratamento de trabalho de parto prematuro e disfunção erétil (Chiba e Misawa, 2004; Chiba et al., 2010).

Além de todas essas funções, o Y-27632 mostrou relaxar o músculo liso em brônquios humanos (Yamagata et al., 2000; Yoshii et al., 1999) e artéria pulmonar (Yamagata et al., 2000).

1.2.5 Sensibilização do Ca^{2+} mediada pela Rho quinase no músculo liso das vias aéreas

A hiperresponsividade de vias aéreas presente em pacientes asmáticos tem sido experimentalmente demonstrada em modelos animais depois de repetidas inalações com antígeno (Misawa e Chiba, 1993; Chiba e Misawa, 1995; Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2005; Prado et al., 2006a; Angeli et al., 2008; Ruiz-Schütz et al., 2009). Acredita-se que os mecanismos responsáveis pela hiperresponsividade das vias aéreas existam, pelo menos em parte, devido à sensibilização do Ca^{2+} mediada por agonistas (Chiba e Misawa, 2004).

A sensibilização do Ca^{2+} nas vias aéreas já foi demonstrada em cães (Bremerich et al., 1997), porcos (Croxtton et al., 1998), traquéia de coelhos (Yoshii et al., 1999) e brônquios de humanos (Yoshii et al., 1999; Yamagata et al., 2000).

Como o Ca^{2+} citosólico parece estar presente em níveis normais mesmo em músculos lisos brônquicos hiperresponsivos (Chiba et al., 1999), estes achados colaboram com a hipótese de que a sensibilização do Ca^{2+} induzida pela estimulação de agonistas no músculo liso brônquico estaria elevada na hiperresponsividade das vias aéreas (Chiba et al., 2010).

Existem evidências de que tanto um aumento na transcrição quanto uma diminuição na regulação negativa de tradução são causas do aumento da regulação da proteína Rho no músculo liso brônquico da asma, causando hiperresponsividade das vias aéreas (Chiba et al., 2010).

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

Também é importante ressaltar que o tônus da musculatura lisa das vias aéreas é controlado predominantemente pelo sistema parassimpático. O aumento da regulação deste sistema pode contribuir para o aumento do tônus das vias aéreas na asma (Jacoby e Fryer, 2001). Há evidências de que o Y-27632 tenha efeito inibitório sobre a contração mediada por nervos

colinérgicos por atuar em antagonismo à contração induzida pela acetilcolina. Chiba et al. (2001) demonstraram que a inibição da Rho quinase atenua as respostas de contração induzida por acetilcolina no músculo liso brônquico por meio da inibição da sensibilização do Ca^{2+} mediada pela via Rho/Rho quinase.

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

Todos estes resultados tornam a via Rho/Rho quinase um possível alvo terapêutico para o tratamento de doenças obstrutivas tais como a asma brônquica.

1.2.6 Outras funções da Rho quinase

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

1.2.6.1 Inflamação das Vias Aéreas

O potencial de uma droga para o tratamento da asma é avaliado por sua efetividade contra um ou mais mecanismos da resposta alérgica (Barnes, 2006). A Rho quinase é uma proteína com importante atuação sobre a inflamação (Henry et al., 2005). A via da Rho quinase participa em vários processos que constituem a inflamação das vias aéreas, incluindo migração, quimiotaxia e infiltração das células inflamatórias para as vias aéreas (Schaafsma et al., 2008).

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

A inibição da Rho quinase também resulta em redução da liberação de IL-2, IFN-gama, IL-4 e IL-5 de células T periféricas ativadas em indivíduos normais (Aihara et al., 2003). Em indivíduos asmáticos, é capaz de reduzir a

liberação de IL-2 e IL-5, porém fracamente reduz a liberação de IL-4 e IFN-gama. Esta variação sugere diferenças nos mecanismos subjacentes aos efeitos sobre a liberação de citocinas em indivíduos asmáticos (Aihara et al., 2004). De qualquer forma, embora não contribua positivamente no equilíbrio Th-2, o efeito antiinflamatório está presente, uma vez que elevação de IFN-gama está relacionado a aumento da responsividade das vias aéreas (Hacken et al., 1998) e aumento na produção de IL-4 contribui para o excesso de produção de IgE e facilita a inflamação alérgica em asmáticos (Kawano e Noma, 1995).

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

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

De modo geral, o Y-27632 parece inibir o número total de células inflamatórias totais para as vias aéreas, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos

em cobaias sensibilizadas tratadas em relação aos controles (Schaafsma et al., 2008).

Além disso, a Rho quinase tem relação com as células dendríticas. Em indivíduos asmáticos, as células dendríticas apresentam propriedades funcionais diferentes em relação às células de indivíduos não asmáticos (Upham e Stick, 2006). Interessantemente, a Rho quinase tem função essencial na regulação da função das células dendríticas, incluindo mudanças na adesão e morfologia celular, produção de interleucina-12 (IL-12) e interações com células T (Kobayashi et al., 2001)

1.2.6.2 Remodelamento das Vias Aéreas

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

A via da Rho quinase também pode contribuir para o espessamento da musculatura lisa das vias aéreas através de seus efeitos sobre a migração de miócitos, importante processo na reparação tecidual e

remodelamento das vias aéreas. Os mecanismos pelos quais a via Rho/Rho quinase afeta a migração de células musculares lisas ainda não foram completamente elucidados, mas parecem envolver modulação da fosforilação da CLM e dinâmica da actina, que são eventos importantes no controle das respostas migratórias dos miócitos (Gerthoffer, 2007).

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

1.2.6.3 Neuromodulação

O tônus das vias aéreas é controlado principalmente pelo sistema parassimpático. Já foi demonstrado que a inibição da Rho quinase diminui as respostas contráteis mediadas por nervos colinérgicos, com redução do tônus do músculo liso das vias aéreas (Fernandes et al., 2006). A Rho quinase altera o tônus da musculatura lisa modulando a liberação a liberação de neurotransmissor dos nervos colinérgicos das vias aéreas, mas os mecanismos exatos responsáveis por essa modulação não são conhecidos (Fernandes et al., 2007).

1.2.6.4 Infecção Viral do Trato Respiratório

Sabe-se que as infecções virais do trato respiratório estão envolvidas na patogenia da asma. Acredita-se que a ativação Rho/Rho quinase facilite este tipo de infecção (Fernandes et al., 2007). Em resumo, a glicoproteína F do vírus sincicial respiratório (VSR) media a fusão na membrana e o vírus entra. A Rho interage com esta proteína F e media a formação de sincício induzida pelo VSR (Pastey et al., 1999). A infecção por VSR induz isoprenilação e associação à membrana e ativação da via Rho, resultando em modificações no citoesqueleto, o que facilita a replicação do VSR e da doença (Gower et al, 2001). Além disso, a inibição da Rho quinase suprime a hiperresponsividade das vias aéreas induzida por metacolina em camundongos sensibilizados com alérgeno e infectados com VSR, confirmando a implicação da via Rho/Rho quinase na infecção por VSR (Hashimoto et al., 2002b).

1.3 Justificativas do Estudo

As informações acima apresentadas evidenciam o papel da Rho quinase em diversos aspectos da fisiopatogenia da asma, principalmente no que se refere à hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas, por meio da inibição aguda da atividade da Rho quinase. Entretanto, ainda não existem estudos que demonstrem os efeitos da inibição crônica da Rho

quinase sobre a mecânica do sistema respiratório, resposta inflamatória, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo. A compreensão do envolvimento da Rho quinase na asma é de fundamental importância para melhor compreensão sobre a fisiopatogenia da doença, bem como para avaliar o papel do inibidor da Rho quinase como um possível agente farmacológico para tratamento da asma.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

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

1. Alterações de mecânica do sistema respiratório desencadeadas pelo estímulo antigênico;
2. Alterações da matriz extracelular na área de parede das vias aéreas: conteúdo de fibras elásticas e de fibras colágenas;
3. Recrutamento eosinofílico na parede das vias aéreas;
4. Expressão de citocinas inflamatórias na parede das vias aéreas (IL-4, IL-2, IL-5, IL-13 e IFN-gama);
5. Resposta de estresse oxidativo na área de parede das vias aéreas: expressão de iNOS, 8-iso-PGF2 α e fator nuclear (NF) κ B;
6. Conteúdo de actina na parede das vias aéreas;
7. Expressão de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β na parede das vias aéreas.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados neste estudo cobaias sadias do sexo masculino com 3 semanas de idade e pesando 300-350g inicialmente. Os animais receberam cuidado conforme o “guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH, 1985). Todos os protocolos e procedimentos descritos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (Protocolo de Pesquisa número 0246/09).

3.2 Grupos Experimentais

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

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

3.3 Indução da Inflamação Pulmonar Alérgica Crônica

A indução da inflamação pulmonar alérgica crônica foi realizada conforme descrito previamente (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2005b; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Ruiz Schütz et al., 2009). Em resumo, os animais foram colocados individualmente em uma caixa acrílica (30cm×15cm×20cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (Soniclear, São Paulo, Brasil) (figura 12). Logo após, aerossol de solução de ovoalbumina (Sigma Chemical, St. Louis, MO) diluída em soro fisiológico estéril a 0,9% (salina) era gerado por 15 minutos ou até o início de desconforto respiratório, definido pela presença de espirros, coriza, tosse e/ou tiragem da parede torácica. O tempo que a cobaia permanecia em contato com o aerossol foi denominado “tempo de inalação”. O protocolo de sete inalações foi realizado duas vezes por semana durante um período de 4 semanas, com a concentração de ovoalbumina sendo aumentada (1~5 mg/mL) para evitar tolerância. Nas primeiras quatro semanas (inalações 1-4), a dose de ovoalbumina usada foi 1 mg/mL. Na terceira semana (5ª e 6ª inalações), os animais receberam uma solução com 2,5 mg/mL de ovoalbumina. Na última semana do protocolo (quarta semana; 7ª inalação), a dose foi aumentada para 5 mg/mL de ovoalbumina. Os animais controle (grupos SAL e SAL-RHO) foram

submetidos ao mesmo protocolo de inalações, mas com salina aerossolizada sendo oferecida (Tibério et al., 1997).

Figura 12. Cobaia sendo submetida a inalação com o nebulizador ultrassônico acoplado à caixa acrílica.

3.4 Tratamento com Y-27632

A partir da quinta inalação do protocolo experimental, as cobaias foram expostas a 2 minutos de inalação de 1 milimolar (mM) de Y-27632 (Tocris Bioscience, EUA), 10 minutos antes de cada inalação com ovoalbumina ou soro fisiológico, com base nos dados de um estudo prévio (Iizuka et al., 2000). Estes autores verificaram que 2 minutos de inalação com 1 mM de Y-27632 foi capaz de inibir o aumento da resistência pulmonar induzida por acetilcolina sem alterações na pressão arterial média. Estes autores usaram acetilcolina 10 minutos após a inalação de Y-27632 e verificaram que 1 hora após a inalação da droga seu efeito sobre a

resistência pulmonar já estava presente. Uehata et al. (1997) encontraram que o Y-27632 pode diminuir a pressão arterial média em ratos hipertensos. No presente estudo, no dia da avaliação mecânica, a inalação com Y-27632 foi realizada até 1 hora antes do início do experimento. Foi optado por usar administração da droga via inalação devido ao efeito direto sobre o sistema respiratório, bem como para a minimização de efeitos sistêmicos.

3.5 Mensuração do Óxido Nítrico Exalado

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

medida. O filtro de NO foi acoplado ao ramo inspiratório do ventilador para evitar contaminação ambiental.

3.6 Avaliação da Mecânica Pulmonar

Após a mensuração do NO_{EX} , a avaliação mecânica foi realizada. A pressão traqueal (P_{tr}) foi medida com um transdutor diferencial de pressão (Honeywell, EUA) ligado a uma conexão na cânula traqueal. A medida de fluxo aéreo (V) foi obtida usando um pneumotacógrafo (OEM Medical, Richmond, EUA) conectado à cânula traqueal e ao transdutor de pressão. As mudanças de volume pulmonar (V) foram determinadas por integração digital do sinal de fluxo aéreo. Foi realizada a média de nove a dez ciclos respiratórios para obtenção de um ponto de dados. Os sinais de P_{tr} , V' e V foram coletados antes e depois do desafio com salina (para os grupos SAL e SAL-RHO) ou ovoalbumina (para os grupos OVA e OVA-RHO) e foram armazenados em um microcomputador (Sakae et al., 1994; Tiberio et al., 1997; Prado et al., 2005b; Ruiz Schütz et al., 2009).

As medidas basais de P_{tr} e V' foram realizadas após a estabilização do animal no ventilador. Após isto, desafios de 2 minutos de inalação com aerossol de ovoalbumina (30 mg/mL) ou salina foram feitos no circuito inspiratório através da entrada de ar do ventilador. As medidas de P_{tr} e V' foram obtidas 1 e 3 minutos após o término do desafio.

A elastância (E_{sr}) e resistência (R_{sr}) do sistema respiratório foram obtidas usando a equação do movimento do sistema respiratório: $P_{tr}(t) = E_{sr} \cdot V(t) + R_{sr} \cdot V'(t)$, onde t é tempo.

Imediatamente após o fim da avaliação mecânica, uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cmH₂O foi aplicada ao sistema respiratório e as vias aéreas foram ocluídas no fim da expiração, para manter os pulmões expandidos. Então, as cobaias foram exsanguinadas pela secção da aorta abdominal, a parede torácica anterior foi removida e os pulmões foram removidos em bloco com o coração para os estudos morfométricos e análises histológicas/histoquímicas.

A figura 13 mostra o esquema para a realização das medidas de mecânica do sistema respiratório e coleta de óxido nítrico no ar exalado.

Figura 13. Esquema demonstrando realização da mecânica do sistema respiratório e coleta de óxido nítrico exalado, onde: FR: frequência respiratória; NO_{EX} : óxido nítrico no ar exalado; P_{tr} =pressão traqueal; V' =fluxo aéreo; V_t =volume corrente.

3.7 Estudos Morfométricos

Os pulmões removidos foram fixados com formol a 4% e, após 24 horas, transferidos para etanol a 70%. Cortes aleatórios representando áreas periféricas dos pulmões foram processadas para incorporação da parafina. Cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos. Ao final de todas as colorações imunohistoquímicas, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia (Fischer, Darmstad, Alemanha).

A análise morfométrica foi realizada com um microscópio óptico com um retículo (com 100 pontos e 50 retas) acoplado à ocular, usando a técnica de contagem de pontos (Gundersen et al., 1988). O retículo foi colocado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio (figura 14). Foram selecionadas vias aéreas não-cartilaginosas seccionadas transversalmente.

Figura 14. Posicionamento do retículo na área de parede da via aérea para realização da técnica de contagem de pontos.

3.7.1 Quantificação de fibras colágenas e elásticas

Os cortes de pulmões também foram corados com Picrosirius, um método para a identificação de colágeno e com o método Resorcina-fucsina de Weigert para identificação de fibras elásticas. De cada pulmão, três vias aéreas diferentes foram aleatoriamente selecionadas para quantificar as fibras colágenas e elásticas. A quantificação foi realizada da mesma forma descrita acima. Os cortes de pulmões foram analisados com aumento de 1000x e o volume de proporção de colágeno e fibras elásticas foi determinado dividindo o número de pontos coincidindo com fibras colágenas ou elásticas pelo número total de pontos coincidindo com a área de tecido ao redor da parede da via aérea. Os resultados foram expressos como porcentagem de fibras.

3.7.2 Quantificação de eosinófilos

Para a avaliação de eosinófilos, os pulmões foram corados com a coloração de Luna para grânulos de eosinófilos (Watanabe et al., 2004). Três vias aéreas selecionadas aleatoriamente de cada corte pulmonar foram analisadas com aumento de 1000x. O número de eosinófilos foi determinado como o número de células positivas dentro do retículo dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido ao redor da parede da via aérea ($10^4 \mu\text{m}^2$).

3.7.3 Avaliação das células positivas para citocinas

Para a avaliação da expressão celular de citocinas, os cortes foram desparafinados e lavados 3 vezes por 10 minutos com H_2O_2 10V 3% para inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada com solução de citrato por 30 minutos. Os cortes foram incubados com anticorpos anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-5 e anti-IL-13 (todos da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) diluídos em albumina bovina sérica (BSA) nas proporções 1:200 (IL-5 e IL-13), 1:400 (IL-2) e 1:500 (IL-4), e passaram a noite a 48°C. Um kit ABCVectastain (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, Carpinteria, EUA) foi usada como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris

(Merck, Darmstadt, Alemanha). Três vias aéreas foram analisadas por pulmão a um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas foi expresso como número de células/unidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$).

3.7.4 Avaliação da Expressão Celular de IFN-gama

A imunohistoquímica para o anticorpo Interferon gama foi realizada pelo método LSAB. Os cortes em lâminas previamente silanizadas foram desparafinados e hidratados. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada. Após este processo foi realizada lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em panela de vapor, com tampão citrato pH 6,0, seguida de lavagem com PBS. Após a recuperação o anticorpo primário IFN gama foi diluído em BSA (1:50) e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o Envision Dual Link System Peroxidase (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e obteve-se a revelação pelo cromógeno 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Por fim, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisadas três vias aéreas por pulmão a um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas para IFN-gama foi determinado como o número de células positivas

em cada campo dividido pelo número de pontos na área de parede da via aérea ($10^4 \mu\text{m}^2$).

3.7.5 Avaliação da iNOS

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

3.7.6 Avaliação do 8-isoprostano-PGF2 α

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

3.7.7 Avaliação da Expressão Celular de NFkappa B

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo NFkappa B foi utilizado o método LSAB. As lâminas previamente silanizadas foram

desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H₂O₂ 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela de Pressão Pascal por 1 min a 125°, com tampão citrato pH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário NFkappa B (S Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), título 1:50, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1 hora) e complexo (30 minutos) pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) em estufa a 37°. Ao fim desta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Para finalizar a imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram analisadas três vias aéreas por pulmão a um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas para NFkappa B foi determinado como o número de células positivas em cada campo dividido pelo número de pontos na área de parede da via aérea ($10^4 \mu\text{m}^2$).

3.7.8 Avaliação da Actina

Para a detecção da actina, a imunohistoquímica foi realizada pelo método LSAB para a pesquisa dos marcadores anti-actina de musculatura lisa humana (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Os cortes histológicos

foram desparafinados e posteriormente hidratados em banhos com álcool absoluto, 95° e 70°, por 1 minuto e lavados em água corrente abundante seguida de lavagem com água deionizada. Na sequência, os cortes foram lavados 7 vezes por 5 minutos com H₂O₂ 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Seguiu-se então a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura para o marcador Actina Músculo Liso em solução de citrato pH 6,0 por 30 minutos. Após este período, as lâminas imersas nesta solução foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em PBS, por três vezes. Antes da incubação do anticorpo primário foi realizado bloqueio de proteínas com leite desnatado a 2% por 10 minutos. Então as lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas pelo Kit LSAB Plus-HRP (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). Foi usada 3,3 DAB (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) como cromógeno. Por fim, as lâminas foram abundantemente lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). As análises foram realizadas aplicando a mesma técnica de contagem de pontos descrita anteriormente. A proporção de actina na área ao redor da parede da via aérea foi obtida pela relação entre o número de pontos coincidindo na actina e o tecido não corado. Os cortes foram analisados em aumento 1000x e os resultados expressos em porcentagem.

3.7.9 Avaliação da Expressão Celular de MMP-9

A imunohistoquímica para pesquisa do anticorpo anti-MMP9 foi realizada pelo método LSAB. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas com banhos de álcool 70°, 95° e 100°. Em seguida, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada. Após isto, as lâminas foram lavadas em água corrente, água deionizada e PBS. Em seguida, a recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em panela de pressão por 50 minutos. Após este período, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente e lavadas em água corrente, água deionizada e em PBS. Após os bloqueios, o anticorpo primário monoclonal MMP-9 (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi diluído em BSA 1:500, aplicado sobre os cortes e as lâminas incubadas por toda a noite. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), lavadas em PBS e reveladas pelo cromógeno 3,3 DAB (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). As lâminas foram então lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Três vias aéreas foram analisadas por pulmão a um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas foi expresso como células/unidade de área (10⁴µm²).

3.7.10 Avaliação da Expressão Celular de TIMP-1

A imunohistoquímica utilizada para a pesquisa do anticorpo TIMP-1 foi realizada pela enzima peroxidase. Os cortes silanizados foram desparafinados e hidratados com banhos de álcool a 70°, 95° e 100°, seguidos por lavagem das lâminas em água corrente. Depois disso, as lâminas foram mergulhadas em ácido fórmico por 3 minutos, e novamente lavadas em água corrente e água destilada. Para a recuperação antigênica, obtida através de alta temperatura em panela de pressão Pascal, foi usado tampão citrato pH 6,0 por 1 minuto. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente, água destilada e PBS. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 10V 3% e metanol vol./volume por 10 minutos e depois somente com H₂O₂ 10V 3% por 3 vezes de 5 minutos cada. As lâminas foram então novamente lavadas água corrente, água destilada e PBS. Após os bloqueios, o anticorpo monoclonal TIMP-1 (Lab Vision/NeoMarkers, Freemont, EUA) diluído em BSA 1:50 foi aplicado sobre os cortes e as lâminas incubadas por toda a noite, de 2° a 8°, por no mínimo 12h. As lâminas foram então lavadas em PBS e incubadas pelo kit Novolink Novocastra (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e o cromógeno 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA) foi usado para revelação. Por fim, as lâminas foram lavadas abundantemente com água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Três vias aéreas foram analisadas por

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

3.7.11 Avaliação da Expressão Celular de TGF-beta

A coloração imunohistoquímica para a pesquisa do anticorpo anti-TGF-beta foi realizada pelo método LSAB. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas, e seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada. Em seguida, foi realizada a lavagem em água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura em panela de pressão Pascal. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS. Após os bloqueios, o anticorpo primário TGF-beta (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) foi diluído em BSA em diluição 1:1500, aplicado sobre os cortes e as lâminas incubadas por toda a noite. Após este período, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas pelo kit Novolink Novocastra (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Por fim, as lâminas foram abundantemente lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Três vias aéreas foram analisadas por pulmão a um aumento de 1000x como descrito acima. O número de células positivas foi expresso como células/unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.8 Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP)

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

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

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

3.9 Análise estatística

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

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Tempo de Inalação

Não houve diferenças no tempo de inalação (TI) entre os grupos estudados até a 4ª inalação e todos os animais alcançaram 15 minutos (9000 segundos) de inalação. Nenhum dos grupos de salina (grupos SAL e SAL-RHO) apresentou desconforto respiratório durante as sete inalações. Entre a 5ª e a 7ª inalação, os animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA) apresentaram valores mais baixos de tempo de inalação comparado ao grupo Y-27632 (grupo OVA-RHO) ($532,2 \pm 155,4$ seg e $751,2 \pm 174$ seg, respectivamente; $P < 0,05$). A figura 15 mostra a diferença entre o tempo de inalação dos diferentes grupos.

Figura 15. Média do tempo de inalação apresentada pelos quatro grupos experimentais entre a 5ª e a 7ª inalação. * $P < 0,05$.

As figuras 16, 17 e 18 mostram o TI médio para os quatro grupos experimentais durante a quinta, sexta e sétima inalações separadamente, sendo SAL (TI médio: 900 seg; 900 seg; 900 seg), SAL-Rho (TI médio: 900 seg; 900 seg; 900 seg), OVA (TI médio: $675 \pm 91,2$ seg; $634,3 \pm 95,2$ seg; $630 \pm 45,8$ seg) e OVA-Rho (TI médio: 900 seg; 900 seg; $634,3 \pm 62,6$ seg), respectivamente. Assim, considerando o grupo OVA-RHO, houve melhora significativa do tempo de inalação deste grupo comparativamente ao grupo OVA ($P < 0,05$).

Figura 16. Gráfico de barras do tempo de inalação das cobaias dos quatro grupos experimentais durante a quinta inalação. * $P < 0,05$ comparativamente aos demais grupos.

Figura 17. Gráfico de barras do tempo de inalação das cobaias dos quatro grupos experimentais durante a sexta inalação. * $P < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

Figura 18. Gráfico de barras do tempo de inalação das cobaias dos quatro grupos experimentais durante a sétima inalação. * $P < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-RHO.

4.2 Óxido Nítrico Exalado

A figura 19 mostra os níveis de NO exalado medidos 72 horas após a última inalação com salina ou solução de OVA. Os valores de NO_{EX} foram mais altos no grupo OVA ($27,9 \pm 1,92$ ppb) comparado aos grupos SAL ($15,9 \pm 0,69$ ppb) e SAL-RHO ($14,5 \pm 0,88$ ppb) ($P < 0,001$). O tratamento com Y-27632 reduziu o NO exalado para o grupo OVA-RHO ($20,2 \pm 2,55$ ppb) comparado ao grupo OVA ($P < 0,05$).

Figura 19. Gráfico de barras para a concentração de NO exalado das cobaias anestesiadas. O NO_{EX} foi coletado 72 h após a 7ª inalação (antes do desafio) com salina ou solução de OVA nos quatro grupos experimentais * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

4.3 Avaliação da Mecânica Pulmonar

Não houve diferenças nos valores basais de resistência (Rrs) e elastância (Ers) do sistema respiratório entre os grupos experimentais (tabela 3).

Grupo	Média ± erro padrão	
	Rrs (cmH ₂ O.mL ⁻¹ .s)	Ers (cmH ₂ O.mL ⁻¹)
SAL	0,23 ± 0,01	2,64 ± 0,16
OVA	0,20 ± 0,02	2,50 ± 0,22
SAL-RHO	0,11 ± 0,01	2,23 ± 0,10
OVA-RHO	0,25 ± 0,05	1,82 ± 0,22

Tabela 3. Valores basais da resistência e elastância do sistema respiratório entre os grupos experimentais.

A porcentagem de aumento máximo da Rrs é mostrado na figura 20. Houve um aumento significativo da porcentagem de Rrs no grupo OVA (141,86 ± 6,6%) comparado aos controles (grupo SAL: 7,98 ± 1,65%; grupo SAL-RHO: 8,22 ± 2,74%). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor de Rho quinase atenuou esta resposta (grupo OVA-RHO: 7,68 ± 7,1%, $P < 0,001$).

Figura 20. . Média $\pm$ erro padrão da porcentagem máxima de aumento na resistência do sistema respiratório (Rrs) obtida após desafio com ovoalbumina (30 mg/mL) ou soro fisiológico nas cobaias anestesiadas. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO.

A porcentagem de aumento máximo da Ers é mostrado na figura 21. Também houve aumento significativo da %Ers no grupo OVA ($10,88 \pm 2,12\%$) comparado aos grupos controles (SAL: $3,20 \pm 0,19\%$; SAL-RHO: $2,39 \pm 0,13\%$). O tratamento com o inibidor da Rho quinase reduziu esta resposta comparado ao grupo OVA (grupo OVA-RHO: $2,28 \pm 0,21\%$; $P < 0,001$). da

Figura 21. . Média $\pm$ erro padrão da porcentagem máxima de aumento na elastância do sistema respiratório (Ers) obtida após desafio com ovoalbumina (30 mg/mL) ou soro fisiológico nas cobaias anestesiadas. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO.

4.4 Análise Morfométrica

O volume de proporção de fibras elásticas é mostrado na figura 22. O conteúdo de fibras elásticas foi mais alto nos grupos de animais expostos a ovoalbumina (OVA: $8,01 \pm 0,63\%$ e OVA-RHO: $4,09 \pm 0,45\%$) comparado às cobaias expostas a salina (grupo SAL: $1,38 \pm 0,63\%$; grupo SAL-RHO: $1,45 \pm 0,47\%$, $P < 0.001$). Os animais sensibilizados tratados com Y-27632

apresentaram menor conteúdo de fibras elásticas comparado aos animais sensibilizados e não tratados (grupo OVA, $P<0,05$).

Figura 22. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do conteúdo de fibras elásticas para os quatro grupos experimentais. Os resultados estão expressos em porcentagem. * $P<0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO; ** $P<0,05$ comparado ao grupo OVA.

A figura 23 mostra que também houve aumento no conteúdo de colágeno nas vias aéreas das cobaias expostas a ovoalbumina (OVA: $22,57 \pm 1,24\%$; OVA-RHO: $14,09 \pm 2,65\%$) comparado aos grupos expostos a soro fisiológico (SAL: $13,64 \pm 1,59\%$; SAL-RHO: $14,45\% \pm 2,09\%$). O tratamento com Y-27632 também atenuou o conteúdo de fibras colágenas nos animais

expostos a ovoalbumina em relação aos não tratados ($P<0,05$).

Figura 23. Valores de média $\pm$ erro padrão do conteúdo de colágeno em cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou solução salina e então tratados com Y-27632 ou veículo. * $P<0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO.

A figura 24 mostra os valores da quantificação de eosinófilos nas vias aéreas nos quatro grupos experimentais. Foi observado que houve um aumento na quantidade de eosinófilos nas cobaias expostas a ovoalbumina (OVA: $27,42 \pm 4,95$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos controles (SAL: $6,67 \pm 1,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; SAL-RHO: $4,57 \pm 0,44$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P<0,001$). O

tratamento com o inibidor da Rho quinase reduziu o número destas células nos animais expostos a inalação de ovoalbumina (OVA-RHO: $13,26 \pm 1,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente aos animais não tratados ($P < 0,05$).

Figura 24. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão dos valores de densidade de eosinófilos nos pulmões dos animais expostos a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratados com inibidor da Rho quinase ou veículo. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL-RHO.

A figura 25 mostra o número de células positivas para IL-2 para todos os grupos experimentais. Houve aumento no número de células positivas para IL-2 nas vias aéreas dos animais expostos a ovoalbumina não tratados

(grupo OVA: $33,07 \pm 0,72$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos expostos a inalação com solução salina (grupo SAL: $2,86 \pm 0,72$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; e grupo SAL-RHO: $6,70 \pm 1,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O número de células positivas para IL-2 no grupo exposto a OVA e tratado com Y-27632 foi reduzido (grupo OVA-RHO: $11,08 \pm 0,87$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$).

Figura 25. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2. * $P < 0,001$ comparado aos outros grupos; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

Também foi observado (figura 26) aumento do número de células positivas para IL-4 entre os animais expostos a inalações de ovoalbumina e não tratados (grupo OVA: $14,44 \pm 1,16$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos

animais dos grupos controles (grupos SAL: $3,19 \pm 0,90$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$ e SAL-RHO: $2,59 \pm 0,74$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ao grupo tratado com o inibidor da Rho quinase (OVA-RHO: $8,53 \pm 1,13$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), para o qual foi observado atenuação das células positivas para IL-4 ($P < 0,001$).

Figura 26. Gráfico de barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão das células positivas para IL-4 nas vias aéreas das cobaias. * $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO; ** $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO.

A figura 27 mostra o número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas das cobaias dos quatro grupos experimentais. Foi observado aumento das células positivas para IL-5 nas vias aéreas dos animais sensibilizados com ovoalbumina (grupo OVA: $19,86 \pm 2,49$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$ e

grupo OVA-RHO: $14,42 \pm 1,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos controles (grupo SAL: $5,17 \pm 0,50$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; e grupo SAL-RHO: $5,68 \pm 0,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). Houve redução do número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas das cobaias sensibilizadas com ovoalbumina e tratadas com Y-27632 em relação aos animais do grupo OVA ($P < 0,05$), embora tenha havido diferença entre os animais tratados comparativamente aos controles ($P < 0,001$).

Figura 27. Gráfico de barras para média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para IL-5 na área de vias aéreas dos animais. Os animais expostos a ovoalbumina apresentaram maiores valores de células positivas para IL-5 em relação aos expostos a salina. O grupo OVA também apresentou maiores valores de células positivas para IL-5 em relação ao grupo OVA-RHO. * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,001$ comparado aos grupos SAL e SAL-RHO.

O número de células positivas para IL-13 é mostrado na figura 28. O grupo de cobaias expostas a ovoalbumina apresentaram valores mais altos de células positivas para IL-13 (grupo OVA: $13,39 \pm 1,85$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos de animais expostos a salina (SAL: $8,40 \pm 1,28$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; e SAL-RHO: $6,22 \pm 1,34$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,05$). As cobaias expostas a ovoalbumina tratadas com o inibidor da Rho quinase apresentaram número reduzido de células positivas para IL-13 (grupo OVA-RHO: $8,71 \pm 0,72$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado ao grupo OVA ($P < 0,05$).

Figura 28. Gráfico de barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para IL-13 na área de parede das vias aéreas para todos os grupos experimentais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO.

Também foi observado (figura 29) aumento do número de células positivas para IFN- γ entre os animais expostos a inalações de ovoalbumina não tratados (grupo OVA: $32,14 \pm 1,51$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em comparação aos animais dos grupos controles (grupos SAL: $16,31 \pm 1,46$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$ e SAL-RHO: $16,53 \pm 1,94$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) e ao grupo tratado com o inibidor da Rho quinase (OVA-RHO: $19,58 \pm 2,09$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$), para o qual foi observado atenuação das células positivas para IFN- γ ($P < 0,001$).

Figura 29. Gráfico de barras para média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para IFN- γ na área de vias aéreas dos animais. Os animais expostos a ovoalbumina apresentaram maiores valores de células positivas para IFN- γ em relação aos expostos a salina. O grupo OVA também apresentou maiores valores de células positivas para IFN- γ em relação ao grupo OVA-RHO. * $P<0,001$ comparado aos demais grupos.

As medidas das células positivas para iNOS são apresentadas na figura 30. O número de células positivas para iNOS foi significativamente maior nos animais expostos a ovoalbumina não tratados (grupo OVA: $14,69 \pm 1,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos grupos de animais expostos a salina (SAL: $9,65 \pm 1,37$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; e SAL-RHO: $9,05 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$;

$P < 0,05$) e aos animais expostos a ovoalbumina tratados com Y-27632 (grupo OVA-RHO: $10,37 \pm 0,68$; $P < 0,05$).

Figura 30. Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para expressão de iNOS presente nas vias aéreas das cobaias de todos os grupos experimentais. * $P < 0,05$ em relação aos grupos SAL, SAL-RHO e OVA-RHO.

O volume de proporção de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas das cobaias é mostrado na figura 31. Houve aumento do conteúdo de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas do grupo de animais exposto a ovoalbumina não tratados (grupo OVA: $25,93 \pm 1,62\%$) em comparação aos animais expostos a salina (grupos SAL: $16,55 \pm 2,33\%$ e SAL-RHO: $15,73 \pm 1,89\%$; $P < 0,05$). Os animais

tratados com Y-27632 apresentaram menor conteúdo de 8-iso-PGF2 α (grupo OVA-RHO: 15,58 $\pm$ 2,97%) comparativamente aos animais sensibilizados e não tratados ($P<0,05$).

Figura 31. Gráfico de barras verticais para média $\pm$ erro padrão do volume de proporção de 8-iso-PGF2 α nas vias aéreas das cobaias expostas às sete inalações com solução salina ou ovoalbumina e cronicamente tratadas com Y-27632 ou veículo. Os resultados são expressos em porcentagem. * $P<0,05$ comparado aos outros grupos.

As medidas das células positivas para NFkapa B são apresentadas na figura 32. O número de células positivas para NFkapa B foi significativamente maior nos animais expostos a ovoalbumina não tratados (grupo OVA: 15,37 $\pm$ 1,72 células/10⁴ μ m²) comparado aos grupos de

animais expostos a salina (SAL: $5,12 \pm 0,69$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; e SAL-RHO: $5,05 \pm 0,97$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$) e aos animais expostos a ovoalbumina tratados com Y-27632 (grupo OVA-RHO: $6,58 \pm 0,92$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$).

Figura 32. Média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NFkapa B entre os quatro grupos experimentais. * $P < 0,001$ em relação aos demais grupos.

Quanto ao volume de actina presente na parede das vias aéreas, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,162$) entre qualquer um dos grupos (SAL: $15,45 \pm 0,67\%$; SAL-RHO: $14,31 \pm 2,97\%$; OVA: $22,05 \pm 4,03\%$; e OVA-RHO: $14,17 \pm 1,29\%$).

O número de células positivas para MMP-9 é mostrado na figura 33. Houve um aumento significativo no número de células positivas para MMP-9 no grupo OVA ($24,01 \pm 0,90$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparado aos controles (grupo SAL: $14,09 \pm 1,25$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; grupo SAL-RHO: $12,89 \pm 1,74$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O tratamento dos animais sensibilizados com inibidor de Rho quinase atenuou esta resposta (grupo OVA-RHO: $13,20 \pm 1,96$) comparativamente ao grupo OVA ($P < 0,001$).

Figura 33. Gráfico de barras verticais para média $\pm$ erro padrão do número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas das cobaias expostas às sete inalações com solução salina ou ovoalbumina e cronicamente tratadas com Y-27632 ou veículo. Os resultados são expressos em porcentagem. * $P < 0,001$ comparado aos outros grupos.

A figura 34 mostra o número de células positivas para TIMP-1 para todos os grupos experimentais. Também houve aumento no número de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas dos animais expostos a ovoalbumina não tratados (grupo OVA: $15,52 \pm 2,63$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparado aos grupos expostos a inalação com solução salina (grupo SAL: $5,79 \pm 1,01$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; e grupo SAL-RHO: $4,71 \pm 0,76$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; $P < 0,001$). O número de células positivas para TIMP-1 no grupo exposto a OVA, mas tratado com Y-27632 foi reduzido (grupo OVA-RHO: $9,03 \pm 0,53$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo não tratado ($P < 0,05$).

Figura 34. Barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TIMP-1. * $P < 0,05$ comparado aos outros grupos.

O número de células positivas para TGF- β é mostrado na figura 35. O grupo de cobaias expostas a ovoalbumina apresentaram valores mais altos de células positivas para TGF- β (grupo OVA: $10,8 \pm 0,54$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparado aos grupos de animais expostos a salina (SAL: $6,95 \pm 0,73$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; e SAL-RHO: $6,14 \pm 1,21$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$; $P < 0,05$). As cobaias expostas a ovoalbumina que receberam tratamento com inibidor da Rho quinase também apresentaram número reduzido de células positivas para TGF- β (grupo OVA-RHO: $8,07 \pm 0,67$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) comparado ao grupo OVA ($P < 0,05$).

Figura 35. Gráfico de barras verticais mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β . * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos.

A tabela 4 mostra a análise de correlação da Rrs e da Ers em relação às células inflamatórias, aos marcadores de remodelamento e marcadores de estresse oxidativo. Foram observadas correlações significantes entre todos os parâmetros avaliados.

a

	Rrs Valor R Valor p	Ers Valor R Valor p
Eosinófilos	0,585 0,00673	0,766 0,0000810
IL-2	0,706 0,000509	0,897 0,0000000857
IL-4	0,763 0,0000910	0,684 0,000890
IL-5	0,679 0,00100	0,495 0,0264
IL-13	0,699 0,000605	0,510 0,0216

b

	Rrs Valor R Valor p	Ers Valor R Valor p
Fibras elásticas	0,614 0,00394	0,667 0,00131
Fibras colágenas	0,462 0,0402	0,595 0,00562
TGF- β	0,625 0,00322	0,636 0,00259
TIMP-1	0,640 0,00237	0,756 0,000116
MMP-9	0,795 0,0000280	0,751 0,000137

c

	Rrs Valor R Valor p	Ers Valor R Valor p
NFKappa B	0,823 0,00000846	0,889 0,000000166
iNOS	0,794 0,0000292	0,663 0,00144
NO	0,720 0,000346	0,828 0,00000643
Isoprostano	0,710 0,000457	0,687 0,000815

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

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

A Figura 36 mostra fotomicrografias representativas de vias aéreas de cobaias coradas para IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13. As cobaias submetidas a inalações com ovoalbumina e não tratadas (grupo OVA) apresentou aumento proeminente no número de todas as células positivas para citocinas (figuras 36 B, F, J e N), em relação aos animais não sensibilizados (grupo SAL: figuras 36 A, E, I e M; e grupo SAL-RHO: figuras 36 C, G, K e O) e aos animais do grupo OVA-RHO (figuras 36 D, H, L e P), que receberam tratamento com o inibidor Rho quinase.

Figura 36. Fotomicrografias da técnica de imunohistoquímica das paredes das vias aéreas para detectar IL-2 (painéis A-D, 400x), IL-4 (painéis E-H, 400x), IL-5 (painéis I-L, 400x) e IL-13 (painéis M-P, 400x) de cobaias expostas somente a solução salina (painéis A, E, I e M) ou ovoalbumina (painéis B, F, J e N). As cobaias tratadas expostas à solução salina (painéis C, G, K e O) ou ovoalbumina (painéis D, H, L e P) também estão representadas. Barra de escala = 100 μ m.

As fotomicrografias representativas das vias aéreas dos animais corados com Picrosirius para o conteúdo de colágeno, Resorcina-fucsina de Weighert para o conteúdo de fibras elásticas e imunohistoquímica para o volume de actina e 8-iso-PGF2 α são mostrados na figura 37. Com exceção para a actina, para a qual não foram encontradas diferenças entre os grupos, todos os outros conteúdos de fibras estiveram elevados nos grupos

de animais expostos a ovoalbumina sem tratamento (grupo OVA; figuras 37 B, F, J e N) em comparação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL; figuras 37 A, E, I e M; e grupo SAL-RHO; figuras 37 C, G, K e O). O tratamento com o inibidor Rho quinase para as cobaias expostas a ovoalbumina reduziu o conteúdo de fibras colágenas (fig. 37 D), fibras elásticas (fig. 37 H) e 8-iso-PGF2 α (fig. 37 L).

Figura 37. Fotomicrografias representativas das vias aéreas de cobaias coradas com Picrosirius para o conteúdo de colágeno (painéis A-D, 400x), Resorcina-fucsina de Weighert para o conteúdo de fibras elásticas (painéis E-H, 400x), actina (painéis I-L, 400x) e 8-iso-PGF2 α (painéis M-P, 400x). Os quatro grupos experimentais estão representados: SAL (painéis A, E, I e M), OVA (painéis B, F, J e N), SAL-RHO (painéis C, G, K e O) e OVA-RHO (painéis D, H, L e P). Barra de escala = 100 μ m.

A figura 38 mostra fotomicrografias das paredes das vias aéreas de cobaias dos quatro grupos experimentais submetidas à coloração LUNA para a detecção da densidade de eosinófilos e coloração imunohistoquímica para a detecção de iNOS, NFKapa B e IFN- γ . Os animais expostos a ovoalbumina (grupo OVA) apresentaram infiltração eosinofílica intensa (figura 38 B) e aumento do número de células positivas para iNOS (figura 38 F), NFKapa B (figura 38 J) e IFN- γ (figura 38 11 N) em relação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL: figuras 38 A, E, I e N; E grupo SAL-RHO: figuras 38 C, G, K e O). O tratamento com Y-27632 diminuiu a infiltração eosinofílica (figura 38 D) e o número de células positivas para iNOS (figura 38 H), NFKapa B (figura 38 11) e IFN- γ (figura 38 P) nas cobaias expostas a ovoalbumina.

Figura 38. Fotomicrografias representativas das vias aéreas de cobaias coradas com LUNA (painéis A-D, 400x) e técnica de imunohistoquímica para iNOS (painéis E-H, 400x), NFKapa B (painéis I-L, 400x) e IFN- γ (painéis M-P, 400x). Todos os grupos experimentais estão representados: SAL (painéis A, E, I e M), OVA (painéis B, F, J e N), SAL-RHO (painéis C, G, K e O) e OVA-RHO (painéis D, H, L e P). Barra de escala = 100 μ m.

As fotomicrografias representativas da coloração imunohistoquímica para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nas vias aéreas dos quatro grupos de animais são mostradas na figura 39. Houve um aumento no número de células positivas para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β nos grupos de animais expostos a ovoalbumina sem tratamento (grupo OVA; figuras 39 B, F e J, respectivamente) em comparação aos animais expostos a solução salina (grupo SAL, figuras 39 A, E e I; e grupo SAL-RHO, figuras 39 C, G e K). O

tratamento com Y-27632 para as cobaias expostas a ovoalbumina reduziu o conteúdo de células positivas para MMP-9 (figura 39 D), TIMP-1 (figura 39 H) e TGF- β (figura 39 L).

Figura 39. Fotomicrografias da técnica imunohistoquímica das paredes de vias aéreas para detectar MMP-9 (painéis A-D, 400x), TIMP-1 (painéis E-H, 400x) e TGF- β (painéis I-L; 400x) de cobaias expostas somente a soro fisiológico (painéis A, E e I) e aquelas expostas apenas à ovoalbumina (painéis B, F e J). As cobaias tratadas expostas a solução salina (C, G e K) ou ovoalbumina (D, H e L) também estão representadas. Barra de escala = 100 μ m.

Embora a análise microscópica tenha sido feita em ampliação 1000x, as fotomicrografias estão mostradas em menor ampliação para melhor destacar as diferenças entre os grupos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o papel do Y-27632, um inibidor da Rho quinase, sobre o estresse oxidativo, a mecânica do sistema respiratório, inflamação e remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas de cobaias com inflamação alérgica crônica das vias aéreas. Os resultados mostraram que a inibição crônica da Rho quinase reduziu a resposta aguda ao desafio antigênico com redução de NO_{EX}. Além disso, a inibição da Rho quinase esteve associada à redução da infiltração eosinofílica, das células positivas para IL-2, IL-4, IL5 e IL-13 e do remodelamento da matriz extracelular na parede das vias aéreas, avaliado através de redução da quantidade de fibras colágenas e elásticas, acompanhada por redução do número de células positivas para MMP-9, TIMP-1 e TGF- β , entre os animais sensibilizados. Ademais, houve uma redução significativa na ativação da via do estresse oxidativo, uma vez que foi observado uma atenuação significativa no número de células positivas para iNOS e do conteúdo de 8-iso-PGF2 α .

O modelo de inflamação alérgica crônica pulmonar em cobaias utilizado no presente estudo já foi previamente estudado em nosso grupo de pesquisa, e os presentes resultados confirmam os dados anteriores, demonstrando que os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram menor período de tempo em contato com o antígeno durante as inalações (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2005; Prado et al.,

2005a). Além disso, esses estudos anteriores confirmaram a presença de hiperresponsividade das vias aéreas (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2005; Prado et al., 2005a; Ruiz-Schütz et al., 2009), inflamação (Prado et al., 2006; Ruiz-Schütz et al., 2009; Prado et al., 2005a) e remodelamento (Prado et al., 2006; Ruiz-Schütz et al., 2009; Prado et al., 2005a) entre as cobaias sensibilizadas, constituindo um modelo interessante para o estudo de possíveis estratégias terapêuticas para a asma.

O tratamento com o inibidor de Rho quinase foi realizado a partir da 5ª inalação para evitar interferência com o processo de sensibilização. Também foi demonstrado anteriormente que, neste momento, as cobaias já estão sensibilizadas e mostram um aumento nos anticorpos anafiláticos específicos IgG1 detectados usando a técnica de anafilaxia cutânea passiva (Tibério et al., 1997). Esta elevação nos anticorpos específicos IgG1 nos grupos experimentais expostos a ovoalbumina também foi demonstrada no presente estudo.

A resposta aguda à exposição ao antígeno foi avaliada pelo tempo que as cobaias foram capazes de permanecer em contato com o aerossol de ovoalbumina (tempo de inalação). Neste contexto, o tratamento com o inibidor da Rho quinase atenuou esta resposta nos animais sensibilizados. Sabe-se que a reação aguda ao desafio com antígeno pode estar relacionada a vários mecanismos, incluindo respostas do músculo liso que, provavelmente, foram expressivamente modificadas pelo tratamento com Y-27632.

O tratamento crônico com Y-27632 causou uma diminuição significativa no nível de NO exalado medido nas cobaias sensibilizadas com ovoalbumina. O NO_{EX} é um biomarcador não-invasivo bem estabelecido de inflamação das vias aéreas que pode ser usado para a avaliação da gravidade da asma, sendo que níveis elevados de NO_{EX} estão associados à inflamação, tanto em seres humanos (Kharitonov et al., 1994; Bukstein et al., 2011) quanto em modelos animais (Leick-Maldonado et al., 2005; Prado et al., 2005a; Starling et al., 2009).

O nível de NO detectado no ar expirado é tradicionalmente usado para avaliação da eficácia de tratamentos testados em modelos experimentais de inflamação pulmonar (Prado et al., 2006). Curiosamente, estudos anteriores mostraram que, no mesmo modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica utilizado neste estudo, o óxido nítrico derivado de isoformas constitutivas age como um potente broncodilatador, vasodilatador e protetor da deposição de fibras colágenas ao redor de vias aéreas e vasos (Prado et al., 2005a). Além disso, quando inibido exclusivamente o óxido nítrico derivado da isoforma iNOS, observou-se uma atenuação da constrição das vias aéreas, inflamação e processos de remodelamento, reduzindo tanto a deposição de colágeno quanto a de fibras elásticas nas vias aéreas e no parênquima pulmonar distal, sugerindo a contribuição de outras isoformas de NO na fisiopatogenia da asma (Prado et al., 2006; Starling et al., 2009).

Também foi notado no presente estudo que os valores basais de resistência e elastância do sistema respiratório nos animais tratados com Y-

27632 e naqueles não tratados mantiveram-se inalterados. No entanto, as respostas máximas ao desafio com antígeno foram significativamente reduzidas pela inibição da Rho quinase nos animais sensibilizados. Há evidências de que a ativação da Rho quinase regula a contratilidade actina/miosina, a expressão de mediadores inflamatórios, além da adesão de leucócitos e transmigração através das células endoteliais do pulmão durante a resposta inflamatória (Mong e Wang, 2009). É importante considerar que a compreensão sobre a anormalidade das propriedades do músculo liso das vias aéreas é um dos fatores mais importantes a serem ponderados para o desenvolvimento de novas terapias para a asma (Chiba et al., 2010).

Vários estudos já demonstraram os efeitos benéficos da inibição da Rho quinase na hiperresponsividade das vias aéreas em animais sensibilizados (Yoshii et al., 1999; Hashimoto et al., 2002; Gosens et al., 2004; Schaafsma et al., 2004; Taki et al., 2007; Schaafsma et al., 2008; Girodet et al., 2011). A influência da Rho quinase na hiperresponsividade das vias aéreas parece estar, pelo menos em parte, relacionada à sensibilização do Ca^{2+} mediada por agonistas. Os mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} ainda não foram totalmente elucidados, mas estudos recentes têm sugerido que Rho quinase é uma proteína-chave na contração da musculatura lisa, e por isso a Rho quinase surge como um alvo terapêutico na asma (Kureishi et al., 1977; Schaafsma et al., 2006; Hashimoto et al., 2002a; Chiba et al., 2010). A Rho quinase ativada promove

o estado fosforilado da cadeia leve da miosina e contribui para o aumento do nível de contração (Schaafsma et al., 2004; Chiba et al., 2010).

Os efeitos da inibição aguda da Rho quinase em animais sensibilizados foram analisados em alguns estudos (Schaafsma et al., 2008; Fernandes et al., 2006; Zhang et al., 1995; Henry et al., 2005; Witzenrath et al., 2008; Hashimoto et al., 2001; Hanazaki et al., 2000; Hanazaki et al., 2008). Schaafsma et al. (2008) mostraram que a inalação com Y-27632 30 min antes e 8 h após a provocação com alérgeno em cobaias sensibilizadas efetivamente impede o desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas, tanto após a reação imediata quanto tardia das vias aéreas.

Também se constatou que o Y-27632 reduz as contrações mediadas por nervos colinérgicos em preparações traqueais de cobaias e camundongos de forma dose-dependente (Fernandes et al., 2006). No entanto, assim como os broncodilatadores β 2-adrenérgicos, o Y-27632 aumenta a liberação de neurotransmissor dos nervos colinérgicos das vias aéreas. Os possíveis mecanismos responsáveis por este aumento de liberação de neurotransmissor ainda não são claros (Zhang et al., 1995; Fernandes et al., 2006).

O aumento na resistência das vias aéreas induzido por metacolina em ratos alérgicos também já foi reduzido com a administração intranasal de Y-27632 pelo menos até oito horas após a instilação do inibidor da Rho quinase (Henry et al., 2005). Witzenrath et al. (2008) verificaram que o uso

de Y-27632 atenuou a resposta das vias aéreas provocada por metacolina nos pulmões sensibilizados.

Além de atuar sobre a hiperresponsividade das vias aéreas promovendo a contração do músculo liso, a Rho quinase parece mediar a hiperresponsividade das vias aéreas induzida pelo ácido lisofosfatídico (LPA) (Hashimoto et al., 2001; Hashimoto et al., 2002).

A ação broncodilatadora do Y-27632 também foi estudada como adjuvante para o isoflurano, um anestésico volátil tradicionalmente usado para tratar o estado asmático, associado tanto com contração nos músculos das vias aéreas Ca^{2+} - dependente quanto Ca^{2+} -independente (Hanazaki et al., 2000). Hanazaki et al. (2008) verificaram que o relaxamento do músculo liso brônquico de ratos induzido por isoflurano foi significativamente aumentado por uma concentração sub-limiar (1 μM) de Y-27632.

No entanto, é importante ressaltar que não temos conhecimento de estudos anteriores que analisaram os efeitos da inibição crônica da Rho quinase. Acreditamos que a inibição crônica da Rho quinase complementa de maneira fundamental estes estudos anteriores e tem potencial importância na busca de alternativas terapêuticas para a asma. Além disso, o modelo experimental utilizado representa uma resposta inflamatória alérgica crônica, o que não ocorria nos estudos anteriormente citados.

Assim como em estudos anteriores (Tibério et al., 1997; Prado et al., 2006; Prado et al., 2005b), foi observado um aumento no infiltrado eosinofílico nas vias aéreas das cobaias sensibilizadas. Também foi

verificado que o inibidor da Rho quinase foi capaz de atenuar significativamente essa resposta nos animais sensibilizados. Além disso, no presente estudo, foi mostrado que a inibição da Rho quinase diminuiu o número de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13 ao redor da parede das vias aéreas. Estes resultados sugerem que a inibição da Rho quinase modula os eventos de sinalização envolvidos no recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas durante uma resposta inflamatória alérgica.

Alguns estudos sugerem o sistema Rho/ROCK desempenha papel no recrutamento de eosinófilos e secreção de citocinas Th-1 e Th-2 (Aihara et al., 2003; Aihara et al., 2004; Henry et al., 2005). A este respeito, Henry et al. (2005) demonstraram que o tratamento prévio com Y-27632 reduziu o número de eosinófilos recuperados de fluido de lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos sensibilizados com OVA.

Taki et al. (2007) mostraram que outro inibidor da Rho quinase, o Fasudil, reduziu eosinófilos no LBA, vias aéreas e vasos sanguíneos. Ainda no fluido do LBA, este inibidor da Rho quinase diminuiu os níveis aumentados de IL-5, IL-13 e eotaxina. Aihara et al. (2004) mostraram que o Y-27632 suprimiu a liberação de citocinas Th-1 e parcialmente de citocinas Th-2 em pessoas saudáveis, mas em pacientes asmáticos reduziu a liberação de IL-2 e IL-5, mas fracamente reduziu a liberação de IL-4 e IFN-gama. No presente estudo, a inibição da Rho quinase esteve associada a redução significativa dos níveis destas interleucinas e de IFN- γ entre os animais sensibilizados com ovoalbumina, indicando que realmente há uma associação entre a via Rho/Rho quinase e a liberação destes mediadores.

No presente estudo, também foi demonstrada atenuação do número de células positivas para iNOS e do conteúdo de 8-iso-PGF2 α na área de parede das vias aéreas pela inibição da Rho quinase com Y-27632 nos animais sensibilizados. Nossos resultados estão de acordo com McGown et al. (2011), que avaliaram se o inibidor da Rho quinase Fasudil protege contra insuficiência vascular e adesão de leucócitos induzidas por LPS por meio da via NOS. Os autores demonstraram que o Fasudil diminuiu a super-regulação da iNOS induzida por LPS, reduzindo a inflamação microvascular.

Além disso, é mostrado claramente que a ativação da iNOS pode contribuir para a formação de peroxinitrito, que é um agente oxidante formado pela interação entre NO e superóxido. Subsequentemente, a geração de isoprostano pode resultar de peroxidação lipídica induzida pela formação de peroxinitrito (Xia et al., 1998). Foi verificado no presente estudo que a inibição da Rho quinase provocou redução de células positivas para iNOS, o que pode ter contribuído para a atenuação da hiperresponsividade das vias aéreas, do estresse oxidativo e, conseqüentemente, do remodelamento da matriz extracelular. A presença de correlação positiva entre os dados de hiperresponsividade e os marcadores de inflamação, remodelamento e estresse oxidativo reforçam esta idéia. Contudo, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos exatos de ação do Y-27632 sobre o óxido nítrico e o estresse oxidativo.

Em relação à avaliação de alterações no remodelamento da matriz extracelular, houve uma diminuição significativa no conteúdo de fibras colágenas e elásticas nos grupos de animais expostos a ovoalbumina

tratados com o inibidor da Rho quinase em comparação aos grupos não tratados. Há evidências de que o modelo experimental de inflamação pulmonar crônica está associado a um maior conteúdo de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e parênquima distal (Mauad et al., 2004; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009). No entanto, não temos conhecimento de estudos experimentais prévios avaliando o papel da inibição da Rho quinase na resposta de remodelamento.

O remodelamento resulta de processos de reparo em resposta à inflamação persistente, desencadeada por mediadores pró-inflamatórios, metaloproteinases, citocinas e fatores de crescimento (Vignola et al., 2000). Reduzindo o número de células inflamatórias, a inibição da Rho quinase pelo Y-27632 ajuda a prevenir a inflamação crônica e, indiretamente, contribui para a redução do remodelamento, o que poderia ser evidenciado pelo menor conteúdo de colágeno e fibras elásticas nas paredes das vias aéreas.

Em relação a estes resultados, alguns estudos recentes sugeriram a importância da modulação da Rho quinase no processo de remodelamento. Zhou et al. (2011) analisaram os efeitos do Fasudil na proliferação de fibroblastos cardíacos, bem como na síntese de colágeno, induzidas por altas doses de glicose. Os autores mostraram que a ativação da Rho quinase é fundamental para a síntese de colágeno, o que pode estar relacionado a uma combinação de fatores, incluindo a inibição das vias da proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK) e de TGF- β , ambas envolvidas nos processos de fibrose.

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

Já foi demonstrado que a inibição da iNOS reduz MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta na parede vascular brônquica de animais sensibilizados com ovoalbumina. Além da redução da iNOS, no presente estudo também observamos atenuação dos níveis de MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta entre os animais sensibilizados tratados com inibidor da Rho quinase. Todos esses mediadores atuam na produção de colágeno e fibras elásticas, contribuindo para o remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas (Prado et al., 2011). O nível reduzido de células positivas para iNOS com a inibição da Rho quinase encontrado no presente estudo, bem como o reduzido conteúdo de fibras colágenas e elásticas nos grupos tratados, podem ser provavelmente devido a esta via. O número reduzido de iNOS quando a Rho quinase é inibida está de acordo com outros estudos, embora os mecanismos subjacentes não sejam claros (Soliman et al., 2008; McGown et al., 2011).

De fato, parece haver uma relação entre esses mediadores e a Rho quinase. Jiang e George (2011) demonstraram que a inibição da Rho

quinase com Y-27632 preveniu a redução de NO induzida pelo TGF- β 2, evitando a inibição da iNOS, e sugerindo que o TGF- β 2 inibe a expressão de iNOS através de uma via Rho quinase-dependente nas células epiteliais pulmonares.

Também verificamos que o fator de transcrição NFkapa B foi reduzido entre os animais sensibilizados tratados com o inibidor da Rho quinase em relação aos animais não tratados. Da mesma forma, Meyer-Schwezing et al. (2009), avaliando a função da Rho quinase na lesão renal inflamatória em camundongos, verificaram que a inibição da Rho quinase esteve relacionada a atenuação da expressão de NFkapa B, resultando em proteção contra a lesão. Estes dados sugerem que a expressão de NFkapa B seja também Rho quinase-dependente.

A ausência de diferenças na quantidade de actina específica do músculo liso na parede das vias aéreas está de acordo com outros estudos utilizando o mesmo modelo animal de doença pulmonar inflamatória crônica utilizado no presente estudo (Lanças et al, 2006; Angeli et al, 2008; Nakashima et al, 2008).

O presente estudo tem algumas limitações. Foi usada a inibição da Rho quinase com Y-27632 em um modelo experimental de inflamação crônica das vias aéreas. É necessário cautela na extrapolação dos atuais achados diretamente aos seres humanos. No entanto, os presentes resultados reforçam a importância da Rho quinase na hiperresponsividade

das vias aéreas, nas respostas inflamatórias pulmonares, no remodelamento da matriz extracelular e na via do estresse oxidativo.

Além disso, é importante lembrar que o modelo com cobaias é um dos melhores modelos animais para o estudo da asma, devido a fatores como anatomia pulmonar semelhante a dos seres humanos e presença de algumas das características da asma humana, como resposta inflamatória eosinofílica e processo de remodelamento (Ricciardolo et al., 2004). De qualquer forma, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Utilizando o modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias foi possível concluir que:

1. A inibição da Rho quinase diminuiu a hiperresponsividade das vias aéreas em animais sensibilizados, tanto em relação à resistência quanto em relação à elastância do sistema respiratório.
2. A atenuação da resposta de hiperresponsividade não foi dependente da redução do conteúdo de actina na parede das vias aéreas.
3. O tratamento com Y-27632 modulou o remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas, reduzindo o conteúdo de fibras colágenas e elásticas. Esta resposta pode ter sido dependente da atenuação da expressão de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β .
4. A inibição da Rho quinase atenuou a inflamação eosinofílica na parede das vias aéreas, assim como reduziu a expressão das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ nas células inflamatórias presentes na parede vias aéreas.
5. Houve redução da resposta de estresse oxidativo com a inibição da Rho quinase pelo Y-27632, visto que o tratamento realizado atenuou a expressão de iNOS e o conteúdo de 8-iso-PGF 2α .

Houve redução da expressão de NFkappa B nos animais tratados com inibidor da Rho quinase, o que pode representar um dos mecanismos responsáveis pela atenuação da resposta inflamatória, de remodelamento e de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Abraham WM. Animal models of late bronchial responses. *Eur Respir Rev.* 1995;5(29):211-7.
- Adachi T, Vita R, Sannohe S, Stafford S, Alam R, Kayaba H. The functional role of Rho and Rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils. *J Immunol.* 2001;167(8):4609–15.
- Aihara M, Dobashi K, Iizuka K, Nakazawa T, Mori M. Comparison of effects of Y-27632 and Isoprotenerol on release of cytokines from human peripheral T cells. *International Immunopharmacology.* 2003;3(12):1619-25.
- Aihara M, Dobashi K, Iizuka K, Nakazawa T, Mori M. Effect of Y-27632 on release of cytokines from peripheral T cells in asthmatic patients and normal subjects. *International Immunopharmacology.* 2004;4(4):557-61.
- Amirav I, Zacharazewicz A. Non-invasive monitoring of inflammation in asthma using exhaled nitric oxide. *IMAJ.* 2008;10(2):146-8.
- Anderson SD. Indirect challenge tests. Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest.* 2010;138(Suppl 2):25-30.
- Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PR, Tibério IF. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue responses induced by chronic pulmonary inflammation mechanics, eosinophilic and extracellular matrix. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(6):L1197-205.
- Bardi G, Niggli V, Loetscher P. Rho kinase is required for CCR7-mediated polarization and chemotaxis of T lymphocytes. *FEBS Lett.* 2003;542(1-3):79–83.

Barnes PJ. Drugs for asthma. *Br J Pharmacol*. 2006;147(Suppl 1):297–303.

Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousque J, Drazen JM, FitzGerald M et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J*. 2008;31(1):143-78.

Bice DE, Seagrave J, Green FH. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhalation Toxicology*. 2000;12(9):829-862.

Boer J, Meurs H, Flendrig L, Koopal M, Zaagsma J. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology*. 2001;133(8):1235-42.

Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1980;121(2):389–413.

Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, Michel FB. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy*. 1992;47(1):3-11.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WB, Johnson M, Vignola AM. Asthma. from bronchoconstriction to airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(5):1720-45.

Bousquet J, Lacoste JY, Chanez P, Vic P, Godard P, Michel FB. Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153(5):1648–54.

Brannan JD. Bronchial Hyperresponsiveness in the assessment of asthma control. Airway Hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(Suppl 2):11-7.

Bremerich DH, Warner DO, Lorenz RR, Shumway R, Jones KA. Role of protein kinase C in calcium sensitization during muscarinic stimulation in airway smooth muscle. *AM J Physiol*. 1997;273(4):L775–81.

- Buc M, Dzurilla M, Vrlik M, Bucova M. Immunopathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp*. 2009;57(5):331-44.
- Bukstein D, Luskin AT, Brooks EA. Exhaled nitric oxide as a tool in managing and monitoring difficult-to-treat asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32(3):1-8.
- Busse W. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation. Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(Suppl 2):4-10.
- Canning BJ, Chou Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pul Pharmacol Ther*. 2008;21(5):702-20.
- Cantrell DA. GTPases and T cell activation. *Immunol Rev*. 2003;192:122–30.
- Cario-Toumaniantz C, Reillaudoux G, Sauzeau V, Heutte F, Vaillant N, Finet M, Chardin P, Loirand G, Pacaud P. Modulation of RhoA-Rho kinase-mediated Ca^{2+} sensitization of rabbit myometrium during pregnancy - role of Rnd3. *J Physiol (Lond.)* 2003;552(2):403–13.
- Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):405–10.
- Carroll NG, Perry S, Karkhanis A, Harji S, Butt J, James AL, Green FH. The airway longitudinal elastic fiber network and mucosal folding in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1): 244–8.
- Casey PJ. Protein lipidation in cell signaling. *Science*. 1995;268(5208):221-5.
- Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003;49(6):875–84.

Chané P, Wenzel SE, Anderson GP, Anto JM, Bel EH, Boulet LP, Brightling CE, Busse WW, Castro M, Dahlen B, Dahlen SE, Fabbri LM, Holgate ST, Humbert M, Gaga M, Joos GF, Levy B, Rabe KF, Sterk PJ, Wilson SJ, Vachier I. Severe asthma in adults: What are the important questions? *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1337–48.

Chapman JT, Choi AMK. Exhaled monoxides as a pulmonary function test: use of exhaled nitric oxide and carbon monoxide. *Clin Chest Med*. 2001;22(4):817-36.

Chiba Y, Matsusue K, Misawa M. RhoA, a possible target for treatment of airway hyperresponsiveness in bronchial asthma. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010;114(3):239-47.

Chiba Y, Misawa M. Alteration in Ca^{2+} availability involved in antigen-induced airway hyperresponsiveness in rats. *Eur J Pharmacol*. 1995;278(1):79–82.

Chiba Y, Misawa M. The role of RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization of bronchial smooth muscle contraction in airway hyperresponsiveness. *J Smooth Muscle Res*. 2004;40(4-5):155-67.

Chiba Y, Sakai H, Suenaga H, Kamata K, Misawa M. Enhanced Ca^{2+} sensitization of the bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway hyperresponsive rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1999;106(1-2):77–85.

Chiba Y, Takeyama H, Sakai H, Misawa M. Effects of Y-27632 on acetylcholine-induced contraction of intact and permeabilized intrapulmonary bronchial smooth muscles in rats. *Eur J Pharmacol*. 2001;427(1):77-82.

Chitale K, Wingard CJ, Webb RC, Branam H, Stopper VS, Lewis RW, Mills TM. Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nat Med*. 2001;7(1):119–22.

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999;54(9):825-857.

- Cockcroft DW, Davis BE. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):551-9.
- Cockcroft DW. Direct challenge tests. Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(Suppl 2):18-24.
- Cockcroft DW. Nonallergic airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;81(1):111-9.
- Connolly MJ, Arronson PI. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2010;24(1):1-14.
- Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(6):L715-31.
- Croxton TL, Lande B, Hirshman CA. Role of G proteins in agonist-induced Ca²⁺ sensitization of tracheal smooth muscle. *Am J Physiol*. 1998;275(4):L748-55.
- Culotta E, Koshland DE. NO news is good news. *Science*. 1992;258(5090):1862-5.
- Darenfed H, Dayanandan B, Zhang T, Hsieh SHK, Fournier AE, Mandato CA. Molecular Characterization of the effects of Y-27632. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2007;64(2):97-109.
- DATASUS. Disponível em: www.datasus.gov.br.
- de Weck AL, Mayer P, Stemper B, Schiessel B, Pickat L. Dog allergy, a model for allergy genetics. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;113(1-3):55-7.
- Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax*. 1969;24(2):176-9.

Durham SR, Craddock CF, Cookson WO, Benson MK. Increases in airway responsiveness to histamine precede allergen induced late asthmatic responses. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82(5):764-70.

Dweik RA, Comhair SAA, Gaston B, Thunnissen BJM, Farver C, Thomassen MJ, Kavuru M, Hammel J, Abu-Soud HM, Erzurum SC. NO chemicals events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *PNAS*. 2001;98(5):2622-7.

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

Ediger T, Schulte NA, Murphy TJ, Toews ML. Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2003;21(5):759-69.

Fahy JV. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(Suppl 10):46-51.

Fernandes L, D'Aprile A, Self G, McGuire M, Sew T, Henry P, Goldie R. A Rho-kinase inhibitor, Y-27632, reduces cholinergic contraction but not neurotransmitter release. *European Journal of Pharmacology*. 2006;550(1-3):155-61.

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

Fukata Y, Kaibuchi K, Amano M, Kaibuchi K. Rho-kinase pathway inhibitor, Y-27632 in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganisation of non-muscle cells. *Trends Pharmacol*. 2001;22(1):32-9.

Gelb AF, George SC, Silkoff PE, Krishnan A, Fraser C, Taylor CF, Shinar CM, Maginot T. Central and peripheral airway/alveolar sites of exhaled nitric oxide in acute asthma. *Thorax*. 2010;65(7):619-25.

Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007;100(5):607-21.

Giavina-Bianchi P, Aun MV, Bisaccioni C, Agondi R, Kalil J. Difficult-to-control asthma management through the use of a specific protocol. *Clinics*. 2010;65(9):905-18.

Gimeno JC. Modelos experimentales de asma. Aportaciones y limitaciones. *Arch Bronconeumol*. 2003;39(2):54-6.

Girodet P-O, Ozier A, Bara I, Lara J-M T, Marthan R, Berger P. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacology and Therapeutics*. 2011;130(3):325-37.

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

Gower TL, Peebles ME, Collins PL, Graham BS. RhoA is activated during respiratory syncytial virus infection. *Virology*. 2001;283(2):188-96.

Grob NM, Dweik RA. Exhaled nitric oxide in asthma. From diagnosis to monitoring, to screening: are we there yet? *Chest*. 2008;133(4):837-9.

Hacken NH, Oosterhoff Y, Kauffman HF, Guevara L, Satoh T, Tollerud DJ, Postma DS. Elevated serum interferon-gamma in atopic asthma correlates with increased airways responsiveness and circadian peak expiratory flow variation. *Eur Respir J*. 1998;11(2):312-6.

Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(3):236-45.

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

Hanazaki M, Chiba Y, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Sakai H, Misawa M. Y-27632 augments the isoflurane-induced relaxation of bronchial smooth muscle in rats. *J Smooth Muscle Res*. 2008;44(6):189-93.

- Hanazaki M, Jones KA, Warner DO. Effects of intravenous anesthetics on Ca^{2+} sensitivity in canine tracheal smooth muscle. *Anesthesiology*. 2000;92(1):133-9.
- Hargreave FE, Nair P. The definition and diagnosis of asthma. *Clinical et Experimental Allergy*. 2009;39(11):1652-8.
- Hargreave FE, O'Byrne PM, Ramsdale EH. Mediators, airway responsiveness, and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;76(2):272-6.
- Hashimoto K, Peebles Jr RS, Sheller JR, Jarzecka K, Furlong J, Mitchell D, Hartert TV, Graham BS. Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitization and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *Thorax*. 2002b;57(6):524-7.
- Hashimoto T, Nakano Y, Ohata H, Momose K. Lysophosphatidic acid enhances airway response to acetylcholine in guinea pigs. *Life Sci*. 2001;70(2):199-205.
- Hashimoto T, Nakano Y, Yamashita M, Fang Y, Ohata H, Momose K. Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*. 2002a;88(3):256-61.
- Hasslett C, Savill JS, Whyte MK, Stem M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994;345(1313):327-33.
- Hawrylowicz CM; O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):271-83.
- HendeleSL, Asmus M, Chresrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5(Suppl A):107-12.
- Henry PJ, Mann TS, Goldie RG. A Rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchoconstriction and airways hyperresponsiveness in allergic mice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2005;18(1):67-74.

- Herzberg B, Ramos-Barbón D, Tamaoka M, Martin JG, Lavoie JP. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):382-8.
- Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, Seki H, Saida K, takai Y. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*. 1991;267(13):8719-72.
- Hirooka Y, Shimokawa H. Therapeutic potential of Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2005;5(1):31-39.
- Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodeling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J*. 1996;9(4):808-20
- Holgate ST, Lackie PM, Davies DL, Roche WR, Walls AF. The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodeling in asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(Suppl 2):9-95.
- Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*. 2008;57(1):1-10.
- Honing H, van den Berg TK, van der Pol SM, Dijkstra CD, van der Kammen RA, Collard JG, de Vries HE. RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *J Leukoc Biol*. 2004;75(3):523-52.
- Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshii A, Harada T, Dobashi K, Murozono T, Nakazawa T, Mori M. Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*. 2000;406(2):273-9.
- Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(3):522-43.
- Jacoby DB, Fryer AD. Anticholinergic therapy for airways diseases. *Life Sci*. 2001;68(22-23):2565-72.

James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodeling in airway diseases. *Eur Respir J*. 2007;30(1):134-55.

Janssen LJ, Premji M, Netherton S, Catalli A, Cox G, Keshavjee S, Crankshaw DJ. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanos in human and canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295(2):506-11.

Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(6): 1745–53.

Jiang J, George SC. TGF- β 2 reduces nitric oxide synthase mRNA through a ROCK-dependent pathway in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;301(3):L361-7.

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

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

Kapsenberg ML, Hilckens CM, Wierenga EA, Kalinski P. The paradigm of type 1 vs type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy*. 1992;29 (Suppl 2):33-6.

Kawano Y, Noma T. Modulation of mite antigen-induced immune responses by lecithin-bound iodine in peripheral blood lymphocytes from patients with bronchial asthma. *Eur Respir J*. 1995;115(7):312-6.

Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005;11(4):148–52.

Kay AB. T cells as orchestrators of the asthmatic response. *Ciba Found Symp*. 1997;206:56-7.

- Kelly HW. Alveolar nitric oxide concentration, small airways inflammation, and targeted asthma therapy: are we there yet? *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):763-7.
- Kharitonov AS, Yates DH, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increases nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343(8890):133-5.
- Kharitonov SA, Yates D, Springall DR, Buttery L, Polak J, Robbins RA, Barnes PJ. Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest*. 1995;107(Suppl 3):156-7.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273(5272):245-8.
- Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuchi K, Somlyo AV, Somlyo AP. Receptor-coupled permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca^{2+} . *J Biol Chem*. 1988;264(10):5339-42.
- Kobayashi M, Azuma E, Ido M, Hirayama M, Jiang Q, Iwamoto S, Kumamoto T, Yamamoto H, Sakurai M, Komada Y. A pivotal role of Rho GTPase in the regulation of morphology and function of dendritic cells. *J Immunol*. 2001;167(7):3583-91.
- Kondrikov D, Caldwell RB, Dong Z, Su Y. Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(11):1689-98.
- Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12257-60.

- Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipide peroxidation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274(35):24441-4.
- Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IFLC. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in anexperimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(1):145–52.
- Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(Suppl 2):95-102.
- Levy ML, Fletcher M, Price DB, Hausen T, Halbert RJ, Yawan BP. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: diagnosis of respiratory diseases in primary care. *Prim Care Respir J*. 2006;15:20-34.
- Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J*. 2000;16(2):349–54.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Comittee report. *Allergy*. 2004;59(5):469-78.
- Matsumoto H, Niimi A, Nakaji H, Takeda T, Oguma T, Otsuka K, Inoue H, Yamaguchi M, Matsuoka H, Ito I, Hirai T, Chin K, Mishima M. Association of alveolar nitric oxide levels with pulmonary function and its reversibility in stable asthma. *Respiration*. 2010;81(4):311-7.
- Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(8):857–62.

- McGown CM, Brown NJ, Hellewell PG, Brookes ZLS. ROCK induced inflammation of the microcirculation during endotoxemia mediated by nitric oxide synthase. *Microvasc Res*. 2011;81(3):281–8.
- Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15533-7.
- Misawa M, Chiba Y. Repeated antigenic challenge-induced airway hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized rats. *Jpn J Pharmacol*. 1993;61(1):41–50.
- Mong PY, Wang Q. Activation of Rho kinase isoforms in lung endothelial cells during inflammation. *J Immunol*. 2009;182(4):2385-94.
- Montuschi P, Corradi M, Ciabatonni G, Nightngale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):216-20.
- Morrow JD. The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des*. 2006;12(8):895-902.
- Nabe T, Shinoda N, Yamada M, Sekioka T, Saeki Y, Yamamura H, Kohno S. Repeated antigen inhalation-induced reproducible early and late asthma in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*. 1997;75(1):65-75.
- Nagumo H, Sasaki Y, Ono Y, Okamoto H, Seto M, Takuwa Y. Rho kinase inhibitor HA-1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(1):C57–65.
- Nakahata T, Moriuchi H, Yunoki M, Sakamoto K, Ishii K. Y-27632 potentiates relaxant effects of β 2-adrenoceptor agonists in bovine tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2000;389(1):103–6.
- Nakashima AS, Prado CM, Lancas T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular

matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. *J Appl Physiol*. 2008;104(6):1778-85.

Niironen N, Nishimura J, Sakihara C, Nakano H, Kanaide H. Up-regulation of rhoA and rho-kinase mRNAs in the rat myometrium during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230(2):356-9.

Padrid P. Chronic lower airway disease in the dog and cat. *Probe Vet Med*. 1992;4(2):320-44.

Pastey MJ, Crowder Jr JE, Graham BS. RhoA interacts with the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and facilitates virus-induced syncytium formation. *J Virol*. 1999;73(9):7262-70.

Pavord ID, Marin N. Will exhaled nitric oxide monitoring become routine in managing asthma? *Expert Rev Resp Med*. 2009;3(2):107-11.

Pavord ID. Asthma control, airway responsiveness and airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(12):1780-2.

Pedersen S, O'Byrne PM. Exhaled nitric oxide in guideline-based asthma management. *Lancet*. 2008;372(9642):1015-7.

Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CP, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005;26(5):948-68.

Pendharkar S, Mehta S. The clinical significance of exhaled nitric oxide in asthma. *Can Respir J*. 2008;15:99-106.

Perry TT, Corren J, Philip G, Kim EH, Conover-Walker MK, Malice MP, Massaad R, Dass SB, Reiss TF, Wood RA. Protective effect of montelukast on lower and upper respiratory tract responses to short-term cat allergen exposure. *Annals Allergy Asthma Immunol*. 2004;93(5):431-8.

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

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol*. 2005b;288(4):L741-8.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IFLC. Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005a;289(4):L677-83.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(4):457-465.

Prado CM, Yano L, Rocha G, Starling CM, Capelozzi VL, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF. Effects of nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. *Exp Lung Res*. 2011;37(5):259-268.

Ramos-Barbón D, Ludwig MS, Martin JG. Airway remodeling: lessons from animal models. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004;27(1):3-21.

Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet L-F, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, Chanez P, Enright PL, Gibson PG, de Jongste JC, Kerstjens HA, Lazarus SC, Levy ML, O'Byrne PM, Partridge MR, Pavord ID, Sears MR, Sterk PJ, Stoloff SW, Sullivan SD, Szeffler SJ, Thomas MD, Wenzel SE; American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(1):59-99.

Redington AE, Howarth PH. Airway wall remodeling in asthma. *Thorax* 1997;52(4):310-2.

- Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001;54(8):577-89.
- Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65.
- Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003;58(2):175-82.
- Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1(8637):520-4.
- Rodway GW, Chol J, Hoffman LA, Sethi JM. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. *Chron Respir Dis*. 2009;6(1):19-29.
- Ruiz-Schütz VC, Drewiacki T, Nakashima AS, Arantes-Costa FM, Prado CM, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF. Oral tolerance attenuates airway inflammation and remodeling in a model of chronic pulmonary allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165(1):13-21.
- Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest*. 1991;88(2):493-9.
- Sachs-Olsen C, Lodrup Carlsen KC, Mowinckel P, Haland G, Devulapalli CS, Munthe-Kaas MC, Carlsen KH. Diagnostic value of exhaled nitric oxide in childhood asthma and allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21(1):e213-21.
- Saito H, Minamiya Y, Saito S, Ogawa J. Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. *J Leukoc Biol*. 2002;72(4):829-36.
- Sanjar S, Aoki S, Kristersson A, Smith D, Morley J. Antigen challenge induces pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pigs: the effect of anti-asthma drugs. *Br J Pharmacol*. 1990;99(4):679-86.

Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K. Involvement of Rho kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res*. 2000;87(3):195–200.

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

Schaafsma D, Bos ST, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. The inhaled Rho kinase inhibitor Y-27632 protects against allergen-induced acute bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(1):L214-9.

Schaafsma D, Gosens R, Bos ST, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans A. Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol*. 2004;143(4):477-84.

Schaafsma D, Gosens R, Zaagsma J, Halayko AJ, Meurs H. Rho kinase inhibitors: a novel therapeutical intervention in asthma? *Eur J Pharmacol*. 2008b;585(2-3):398-406.

Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Cir Res* 2003;92(4):411-8.

Sheppard MN, Harrison NK. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 1. Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax*. 1992;47(12):1064-74.

Shin YS, Takeda K, Gelfand GW. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2009;1(1):10-8.

Shiraki A, Kume H, Makino Y, Ito S, Shimokata K, Honjo H, Kamiya K. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF₂ α -induced contraction in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy*. 2008;39(2):236-245.

Smith N, Broadley KJ. Optimisation of the sensitization conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(2):183-90.

Solé D, Yamada E, Vanna AT, Werneck G, Freitas SL, Sologuren MJ, Brito M, Rosário Filho NA, Stein RT, Mallol J. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2001;11(2):123-8.

Soliman H, Craig GP, Nagareddy P, Yuen VG, Lin G, Kumar U, McNeill JH, Macleod KM. Role of inducible nitric oxide synthase in induction of RhoA expression in hearts from diabetic rats. *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):322-30.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1325-58.

Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165(2-3):185-94.

Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2007;56(4):341-8.

Sylvester JT. The tone of pulmonary smooth muscle: ROK and Rho music? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L624-30.

Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res Rev Med*. 2002;53:477-98.

Taki F, Kume H, Kobayashi T, Ohta H, Aratake H, Shimokata K. Effects of Rho-kinase inactivation on eosinophilia and hyper-reactivity in murine airways by allergen challenges. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(4):599-607.

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

Tang LF, Du LZ, Zou CC, Gu WZ. Levels of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in guinea pig asthma model following ovalbumin challenge. *Fetal Pediatr Pathol.* 2005;24(2):81-7.

Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet.* 2002;360(9342):1313-22.

Taylor DR. An eye to the future: exhaled nitric oxide as a predictor of clinical outcomes in asthma. *Eur Respir J.* 2010;35(6):1200-2.

Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, Warth TN, Lapa e Silva JR, Saldiva PH, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155(5): 1739-47.

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389(6654):990-4.

Upham JW, Stick SM. Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Current Drug Targets.* 2006;7(5):541-5.

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

Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Zinnanti E, Bousquet J, Bellia V, Bonsignore G. Release of transforming growth factor-beta (TGF-beta) and fibronectin by alveolar macrophages in airway diseases. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(1):114-9.

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

- Vignola AM, Mirabella F, Constanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123(Suppl 3):417-22.
- Watt AP, Schock BC, Ennis M. Neutrophils and eosinophils: clinical implications of their appearance, presence and disappearance in asthma and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(4):415–23.
- Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*. 2002;80(10):629-38.
- Wiggs BR, Moreno R, Hogg JC, Hilliam C, Pare PD. A model of the mechanics of airway narrowing. *J Appl Physiol*. 1990;69(3):849–60.
- Witzenrath M, HRVAens B, Kube SM, Hocke AC, Rosseau S, Hamelmann E, Suttorp N, Schütte H. Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur Respir J*. 2006;28(2):370-7.
- Witzenrath M, HRVAens B, Schmeck B, Kube SM, Hippenstiel S, Rosseau S, Hamelmann E, Suttorp N, Schütte H. Rho-kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(1):9-15.
- Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25804-8.
- Yamagata S, Ichinose M, Sugiura H, Koarai A, Koike K, Shirato K. Effect of a calcium sensitization modulator, Y-27632, on isolated human bronchus and pulmonary artery. *Pulm Pharmacol Ther*. 2000;13(1):25–9.
- Yamaguchi H, Miwa Y, Kasa M, Kitano K, Amano M, Kaibuchi K, Hakoshima T. Structural basis for induced-fit binding of rho-kinase to the inhibitor Y-27632. *J Biochem*. 2006; 140(3):305-11.

- Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, Horie T, Harada T, Nakazawa T, Mori M. Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca^{2+} sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; 20(6):1190–200.
- Zhang XY, Olszewski MA, Robinson NE. β_2 -adrenoceptor activation augments acetylcholine release from tracheal parasympathetic nerves. *Am J Physiol*. 1995;12(6):L950-6.
- Zhou H, Zhang KX, Li YJ, Guo BY, Wang M, Wang M. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, suppresses high glucose-induced proliferation and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(6):387-94.
- Zoritch B. Nitric oxide and asthma. *Arch Dis Child*. 1995;72(3):259-62.
- Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(7):973-88.