Flávia Castro Ribas de Souza

**Efeitos dos inibidores de NFkB e Rho-Quinase
em um modelo de asma animal: comparação
com o tratamento com corticosteroides**

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"
Orientador: Prof. Dra. Iolanda de Fátima
Lopes Calvo Tibério

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2017**

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Flávio Ribas de Souza e Nilce Souza
e meu irmão Henrique Ribas,
que sempre me incentivaram
a prosseguir nos estudos.*

AGRADECIMENTOS

Esta parte de agradecimentos é muito difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças e por esquecimento não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para o trabalho, pois nada na vida conquistamos sozinhos.

Qualquer trabalho científico só é possível com a dedicação de um grupo de pessoas, e este não foi diferente de uma maneira geral gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma participaram de alguma etapa para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Iolanda F. L. C. Tibério por sempre estar ao meu lado, apoiar, ouvir, pelas ajudas, sugestões e amizade. Pelas lições de humildade como pesquisadora, orientadora e acima de tudo como pessoa. Sempre dividindo os seus conhecimentos de forma clara e esperançosa.

À minha amiga Melissa Polaro, companheira de todos os momentos, soube compreender minhas ausências e esquecimentos. Muito obrigada.

Aos queridos companheiros de jornada Renato Fraga, Luciana Aristóteles, Tábata Maruyama, Leandro Camargo, obrigado por tornar todos os momentos estressantes durante o doutorado em momentos leves e agradáveis. Obrigada por formarmos uma ótima equipe!

À Carla Máximo Prado e Edna Leick, pelo cuidado e dedicação com a pesquisa. Minha amorosa e paciente Dineides com todo seu perfeccionismo me ajudou evoluir muito.

À Rosana Vilela, que ajudava a burocracia se tornar mais leve. Muito obrigada pelas conversas, conselhos e carinho.

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

À Esmeralda e Sandrinha, aprendi muito com vocês duas durante meu estágio em imunohistoquímica. Obrigada pelos ensinamentos, carinho todo auxílio que me deram.

Por último e não menos importante, Deus, por me permitir me manter sempre de pé.

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
1.2.	Epidemiologia	3
1.3.	Fisiopatologia	6
1.4.	Fator de transcrição NFκB	17
1.5.	Remodelamento	19
1.6.	Citocinas Inflamatórias na Asma	22
1.7.	Estresse oxidativo	25
1.8.	Asma Grave e Tratamentos	29
1.8.1.	Inibição da Rho-quinase	32
1.8.2.	Inibição do NFκB	38
2.	Objetivos	40
3.	Materiais e Métodos	43
3.1.	Grupos experimentais	45
3.2.	Protocolo de sensibilização	45
3.2.1.	Tratamento com o inibidor da Rho-quinase	46
3.2.2.	Tratamento com o corticosteroide	47
3.2.3.	Tratamento com o inibidor do NFκB	47
3.3.	Avaliação da hiperresponsividade à metacolina	48
3.4.	Determinação das concentrações de óxido nítrico exalado	50
3.5.	Avaliação histológica e imunohistoquímica	50
3.6.	Análise Morfométrica	53

3.7.	Analizador de Imagens	55
3.8.	Dosagem de IgG1, IgG2a e IgE por ELISA	56
3.9.	Análise Estatística	56
4.	Resultados	58
4.1.	Sensibilização: Elisa para IgE, IgG1 e IgG2A	59
4.2.	Hiperresponsividade	63
4.3.	Inflamação	69
4.4.	Resposta de remodelamento	87
4.5.	Estresse oxidativo	95
4.6.	Células positivas para NFκB	100
5.	Discussão	108
6.	Conclusões	130
7.	Referências	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
CD	Célula dendrítica
CLM	Cadeia leve da miosina
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DAB	Diaminobenzidina
eNOS	Óxido nítrico sintase derivada do endotélio
GAPs	proteínas ativadoras de GTPases
GDI	Inibidores de dissociação de GTPase
GDP	Guanina difosfato
Grupo OVA	Animais submetidos a inalação com solução de ovalbumina
Grupo OVA-RHO	Animais submetidos a inalação com ovalbumina e inalação de Y-27632
Grupo OVA-CORT	Animais submetidos a inalação com ovalbumina e tratamento intraperitoneal com dexametasona
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
JNK	Proteína quinase C-Jun-terminal
MMP	Metaloproteinase
MQ	Miosinoquinase
NF	Fator nuclear
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
PBS	Solução tampão salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
ROK	Rho quinase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz
TNF	Fator de necrose tumoral

RESUMO

Souza FCR. Efeitos dos inibidores de NF κ B e Rho quinase em um modelo de asma animal: comparação com o tratamento com corticosteroides [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Embora a grande maioria dos pacientes com asma tenha controle com o padrão de tratamento com corticosteroides, 5 a 10% destes asmáticos ainda desenvolvem algumas formas graves da doença e são considerados pacientes difíceis de controlar. A ativação do NF κ B contribui para a manutenção e desenvolvimento de inflamação pulmonar crônica na fisiopatologia da asma. O éster fenilico do ácido cafeico (CAPE), um componente ativo de própolis das colmeias de abelhas, é conhecido por ter propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras. É conhecido como um potente e um inibidor específico da ativação de NF κ B. Nós anteriormente mostramos que Y27632, um inibidor de Rho quinase, atenuou a resposta pulmonar das vias aéreas, inflamação e remodelamento. Para o nosso conhecimento, tratamentos com os inibidores de NF κ B ou Rho-quinase em comparação com o uso de corticosteroides não foram previamente investigados em um modelo animal de inflamação pulmonar crônica alérgica. **MÉTODOS:** Trinta camundongos BALB/C machos (20 a 25g) foram divididos em cinco grupos (n=6 em cada grupo): SAL (instilado com solução salina), OVA (expostos à ovalbumina), OVA-CAPE (expostos à ovalbumina e tratados com CAPE), OVA-RHO (expostos à ovalbumina e tratados com inibidor de Rho), OVA-CORT (expostos à ovalbumina e tratados com corticosteróide). Os animais foram sensibilizados para ovalbumina durante 28 dias e os controles receberam solução salina. A administração de corticosteróide (1mg/Kg/dia) e CAPE (10mg/Kg/dia) foi feita por via intraperitoneal e Y-27632 (10 mg/kg) administrado por via intranasal, todos nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo experimental. Vinte e quatro horas após a conclusão do protocolo experimental, os animais foram submetidos a uma avaliação da curva de resposta à dose à metacolina, consideramos as respostas máximas da Resistência ao Sistema Respiratório (Rrs) e Elastância (Ers) às 24 horas após o último desafio com ovalbumina (respostas basais e máximas após a metacolina desafio 3, 30 e 300mg/mL). Posteriormente, os pulmões foram removidos e a análise histológica foi realizada usando morfometria. **RESULTADOS:** não houve diferenças nos valores basais de

todos os grupos. expostos à ovalbumina Houve um aumento em Rrs e Ers após o desafio da metacolina em comparação com o grupo SAL ($p < 0,05$). No grupo exposto ao OVA, os tratamentos com CAPE, CORT e RHO reduziram a resposta máxima de Ers em relação ao OVA ($p < 0,05$). Em relação ao tratamento com somente CAPE atenuou a resposta máxima de Rrs em relação ao OVA ($p < 0,05$). Houve diminuição nos eosinófilos, conteúdo de fibras de colágeno, células positivas para iNOS, MMP-9, TIMP-1 em grupos OVA-CAPE, OVA-CORT e OVA-RHO em comparação com os animais sensibilizados (grupo OVA) ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** a inibição de NF κ B e Rho-quinase contribuiu para o controle da hiperresponsividade, inflamação, processo de remodelamento da matriz extracelular e ativação do estresse oxidativo. Embora os inibidores de NF κ B e Rho-quinase sejam uma alternativa ao tratamento da asma, são necessários mais estudos.

Descritores: asma; remodelação das vias aéreas; corticosteroides; éster fenetilico do ácido cafeico; quinases associadas a rho, receptor ativador de fator nuclear kappa-B; camundongos

SUMMARY

Souza FCR. Effects of NF κ B and rho-quinase inhibitors in an animal asthma model: comparison to corticosteroid treatment [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Although the great majority of asthma patients obtain control with the gold standard treatment using corticosteroids, 5 to 10% of these asthmatics still develop some severe forms of the disease, called difficult to control patients. Activation of NF κ B contributes to the maintenance and development of chronic lung inflammation in pathophysiology of asthma. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis from honeybee hives, is known to have anti-inflammatory and immunomodulatory properties. It is known as a potent and a specific inhibitor of NF κ B activation. We previously have shown that Y27632, a Rho-quinase inhibitor, attenuated airway lung responsiveness, inflammation and remodeling. To our knowledge, treatments with the NF κ B or Rho-kinase inhibitors compared to the use of corticosteroids have not been previously investigated in an animal model of chronic allergic lung inflammation. **METHODS:** Thirty male BALB/c mice (20 to 25g) were divided into five groups (n=6 in each group): SAL (saline-instilled), OVA (exposed-ovalbumin), OVA-CAPE (exposed-ovalbumin and treated with CAPE), OVA-RHO (exposed-ovalbumin and treated with Rho inhibitor), OVA-CORT (exposed-ovalbumin and treated with corticosteroid). The BALB/c mice were sensitized to ovalbumin for 28 days and controls received saline. The administration of corticosteroid (1mg/Kg/day) and CAPE (10mg/Kg/day) was made intraperitoneally and Y-27632 (10mg/kg) was intranasally, all on days 22, 24, 26 and 28 of the experimental protocol. Twenty-four hours after completion of the experimental protocol, animals were subject to an evaluation of dose response curve to methacholine. We considered the maximal responses of respiratory system resistance (Rrs) and elastance (Ers) 24 hours after the last challenge with ovalbumin (baseline and maximal responses

after metacholine challenge 3, 30 and 300mg/mL). Afterwards, lungs were removed and histological analysis was performed using morphometry.

RESULTS: There were no differences on baseline values of all groups. Ovalbumin-exposed mice had an increase in Rrs and Ers after methacholine challenge compared to SAL group ($p<0.05$). In OVA-exposed groups, the treatments with CAPE, CORT and RHO reduced maximal response of %Ers compared to OVA ($p<0.05$). In relation to %Rrs only CAPE treatment attenuated the maximal response compared to OVA ($p<0.05$). There was a decrease in eosinophils, collagen fibers content, iNOS, MMP-9, TIMP-1 positive cells in OVA-CAPE, OVA-CORT and OVA-RHO groups compared to only sensitized animals (OVA group) ($p<0.05$). **CONCLUSION:** NF κ B and Rho-kinase inhibition contributes to the control of hyperresponsiveness, inflammation, extracellular matrix remodeling process and oxidative stress activation. Although NF κ B and Rho-kinase inhibitors were an alternative to asthma treatment, more studies are needed.

Descriptors: asthma; airway remodeling; adrenal cortex hormones; caffeic acid phenethyl ester; rho-associated kinases; receptor activator of nuclear factor-kappa B; mice

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASMA BRÔNQUICA

A asma é definida como uma doença crônica das vias aéreas caracterizada pela hiperresponsividade brônquica, inflamação pulmonar, resposta de remodelamento das vias aéreas e obstrução das vias aéreas (Hargreave e Nair, 2009, Park, 2014, Meyer, 2014). Considerada uma condição heterogênea, a asma inclui episódios agudos que revertem espontaneamente ou com tratamento, e a inflamação crônica e/ou mudanças estruturais que podem estar relacionadas a sintomas persistentes e redução da função pulmonar (Reddel et al., 2009; Lemanske e Busse, 2010 e GINA, 2017).

A asma apresenta determinantes genéticos e ambientais. Contudo, sua patogênese não está completamente elucidada e grande parte da sua definição ainda é descritiva. Considerando detalhadamente a recente definição para a asma, elaborada em 2017 pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA), em que levam em consideração suas características clínicas, fisiológicas e patológicas, encontramos que:

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

A asma é uma doença multifatorial que pode acometer todas as faixas etárias. Há dois fatores principais que podem gerar o desenvolvimento da inflamação e a hiperresponsividade brônquica presentes na crise asmática. O

primeiro fator inclui os fatores predisponentes (genéticos) e o segundo fator existente é uma estreita relação entre os fatores ambientais e a doença, tais como: poeira, alimentos, fármacos, pólen, fungos, insetos, exercício, alterações ambientais e meteorológicas, poluentes atmosféricos, infecções, irritantes químicos, estresse e vários outros (Hashimoto et al., 2002b; Lemanske e Busse, 2010). A hiperresponsividade é a principal responsável pelos recorrentes episódios de sibilos, dispneia, tiragem intercostal e tosse (Brannan, 2010). De forma geral, os mecanismos que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma são complexos e interativos.

1.2. EPIDEMIOLOGIA

Sendo uma doença de alta prevalência, ainda é responsável pela mortalidade e altos custos diretos (por exemplo, cuidados hospitalares e medicamentos) e indiretos (por exemplo, perda de trabalho ou dias escolares) e em muitas vezes está associada a diversas comorbidades. Tem sido demonstrado que os custos indiretos de asma representam a maior parte dos custos, além disso, o seu efeito possui grande impacto na produtividade. Uma das razões por trás é que pacientes com asma são relativamente jovens e são considerados livres de comorbidades. O aumento geral da longevidade e do aumento da idade levará inevitavelmente a mais sujeitos asmáticos nos ambientes de trabalho (Ehteshami-Afsharet al., 2016).

Atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). As mulheres são as mais

acometidas pela doença: cerca de 3,9 milhões delas afirmaram ter diagnóstico da enfermidade contra 2,4 milhões de homens, ou seja, prevalência de 39% a mais entre o sexo feminino. (Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS, 2016).

Responsável por mais de 100 mil internações no SUS, estima-se que 300 milhões de pessoas no mundo, incluindo crianças, sofrem com a asma. Seu sintoma é caracterizado, principalmente, por dificuldade respiratória, tosse seca, chiado ou ruído no peito e ansiedade (Organização Mundial de Saúde - OMS).

Na maioria dos indivíduos asmáticos, a doença tem sua origem durante a infância, com tendência ao desaparecimento de episódios de sibilos (chiadores transitórios) com o passar dos anos. Outros evoluem com sintomas persistentes que podem cessar ainda na adolescência, mas alguns evoluem com sintomas persistentes que podem tanto cessar antes da adolescência (indivíduos primariamente não atópicos) quanto continuar pela adolescência (indivíduos atópicos). Uma vez em remissão, a doença pode permanecer em repouso, ou o indivíduo pode apresentar recaídas ao longo da fase adulta (Lemanske e Busse, 2010).

A maioria dos pacientes apresenta doença leve, mas uma minoria significativa sofre de formas mais graves da doença, apesar de condutas médicas adequadas. O atendimento e os cuidados a estes pacientes, principalmente os graves, estão associados a repercussões psicossociais e econômicas, representando um sério problema na saúde pública mundial (Buc et al., 2009; GINA, 2017).

A ideia de que a asma é uma doença única, foi recentemente questionada, e agora é considerada como uma doença heterogênea, com diferentes mecanismos patogênicos, comportamentos clínicos e resposta ao tratamento. Segundo a revisão da literatura realizada por Bagnasco et al. (2016), o processo de fenotipagem da asma começou há cerca de 10 anos, com o objetivo de identificar grupos homogêneos (quer clínica ou biologicamente) dos pacientes. Atualmente, mais de 100 genes relacionados com a patogênese da asma foram identificados.

Em sua maioria, a asma é controlada através de medicação prescrita e tomada regularmente, e as diretrizes internacionais ajudam o médico na implementação de uma escalada gradual do tratamento até os sintomas estarem controlados. No entanto, um percentual pequeno de pacientes se mantém sintomático mesmo com o tratamento adequado. Baixa adesão pode ser uma razão para isso. Krishnan et al. (2004) estudando pacientes hospitalizados por exacerbações de asma, demonstraram que a adesão ao tratamento, medida eletronicamente pelo uso dos corticosteroides inalados e orais, caiu para aproximadamente 50%, dentro de 7 dias após a alta hospitalar. A baixa aderência foi correlacionada com o pior controle dos sintomas.

É reconhecido que uma pequena proporção de pacientes possui uma resposta reduzida às medicações, em particular aos corticosteroides (Busse; Banks-Schlegel; Wenzel, 2000). Estes pacientes possuem maior mortalidade e suas vidas são marcadas muitas vezes por esta condição, não obstante a quantidade desproporcional de recursos de saúde gastos. Certamente, a adesão ao tratamento e à educação dos pacientes permanecem o objetivo principal, mas o conhecimento cada vez mais detalhado sobre os mecanismos patogênicos e

as novas biotecnologias oferecem a oportunidade de melhor tratamento à doença. Sendo assim, é de grande importância as características clínicas que especificam fenótipos distintos de asma, sendo fundamentais para um melhor entendimento da patogênese da doença para um tratamento adequado (Nanzer; Menzies-Gow, 2014).

1.3. FISIOPATOLOGIA

A asma envolve um grande número de diferentes tipos de componentes moleculares e celulares interagindo através de vias fisiopatológicas complexas (Singh; Shah; Singh, 2016). Uma vez em contato com o alérgeno, a resposta alérgica é desencadeada em indivíduos alérgicos.

Uma série de fatores que, geralmente são tolerados por indivíduos normais, são capazes de gerar exacerbações dos sintomas asmáticos (GINA, 2017) como, por exemplo, a exposição a alérgenos, vírus, poluentes, emoções, lipossácarides. Após a fase de sensibilização, quando houver o próximo contato do indivíduo com o antígeno, a grande maioria dos asmáticos apresentam a resposta inflamatória aguda, também chamada de fase imediata. Ainda nesta fase ocorre a desgranulação de mástocitos, a liberação de histamina e cistenil-leucotrienos, em um período de 2 a 4 horas após o contato com o antígeno, com posterior contração da musculatura lisa peribrônquica. A partir desse momento, se inicia o recrutamento de linfócitos e eosinófilos, responsáveis pela liberação de outros mediadores que ocasionam alteração e ou lesão da musculatura lisa, aumento de permeabilidade vascular, hiperresponsividade e aumento na produção de muco, o que caracteriza a resposta tardia. Esta ocorre de 6 a 9

horas após o contato com o antígeno (Larche et al., 2003; Robinson, 2004; Kay et al., 2004; Akbari et al., 2006).

A sensibilização é o processo inicial para o desenvolvimento da asma, na qual as células dendríticas presentes na mucosa brônquica são ativadas. A ativação gera a 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. Quando ativadas as células Th2 liberam interleucinas (IL), ocorre diferenciação linfocitária no sentido de uma resposta de perfil de citocinas Th2, além de haver estímulo à produção de anticorpos IgE (Robinson, 2004; Kay et al., 2004), contribuindo para a lesão e inflamação observada na asma. (Andrade, et al., 2005 e Hamid, 2003). A liberação de diversos mediadores inflamatórios como a histamina, espécies reativas de oxigênio desencadearão uma resposta inflamatória, na qual mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos CD4⁺ Th2 estarão contribuindo com o desencadeamento de sinais e sintomas característicos da asma como a hiperresponsividade brônquica, obstrução das vias aéreas, secreção mucosa e vasodilatação (Busse et al., 2001; Platts-Mills et al., 2001).

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 conseqüentemente dos eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5 especificamente recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendele et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010). Os eosinófilos, por sua vez, são células características 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 macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteases, proteinases, que podem degradar componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (Tillie-Leblond et al., 2005).

Os eosinófilos possuem a capacidade de armazenar citocinas pré-formadas, quimiocinas e fatores de crescimento disponíveis para uso imediato, além de manter a função de barreira epitelial, podendo afetar o remodelamento do tecido e a imunidade adaptativa. Os eosinófilos liberam proteínas granulares e citocinas que medeiam o dano epitelial e o recrutamento de outras células inflamatórias (Shamri et al., 2011). O acúmulo local de eosinófilos está envolvido na patogênese de doenças alérgicas como a asma (Kato et al., 2006; Uhm et al., 2012).

Os eosinófilos são uma fonte rica em proteínas básicas de grânulos, tais como proteína básica principal, peroxidase eosinofílica e proteína catiônica eosinofílica e liberam superóxido, potencialmente prejudicial aos tecidos (Kariyawasam & Robinson 2006). Estudos posteriores demonstraram que a diminuição de eosinófilos pode modificar certas proteínas da matriz na membrana basal subepitelial, sugerindo que o eosinófilo possa desempenhar um papel importante no remodelamento da via aérea (Kay et al. 2004). Além deles,

os mastócitos podem produzir citocinas como TNF- α , IL-4, FGF (fator de crescimento fibroblástico), as quais influenciam a proliferação fibroblástica e atuam na digestão da matriz extracelular (Tillie-Leblond et al., 2005).

Carroll et al (2002) demonstraram uma relação entre a inflamação das vias aéreas, obstrução pela presença de muco e gravidade da asma. Sugerem que a desgranulação de mastócitos, está relacionada à secreção de muco. Ainda mostraram que o aumento da desgranulação dos mastócitos e o aumento da área das glândulas mucosas contribuem para a rápida secreção de quantidades crescentes de muco nos casos de asma.

A resposta tardia envolve também o recrutamento e ativação de eosinófilos, células T CD4⁺, basófilos, neutrófilos e macrófagos (Calhoun, 2003; Robinson, 2004; Ko et al., 2005). Na fase tardia ocorre também a deposição de matriz extracelular, aumento da musculatura lisa brônquica, hiperplasia das glândulas produtoras de muco e remodelamento tecidual. A deposição de matriz extracelular, aumento na secreção de muco e espessamento das vias aéreas contribuem na lesão tecidual com perda de epitélio e alteração nas propriedades mecânicas das vias aéreas (Lazaar e Panettieri, 2004; Luster e Tager, 2004).

O processo inflamatório crônico provoca alterações estruturais irreversíveis causadas tanto pela ativação de células inflamatórias quanto pela falta de reparo adequado à lesão crônica, explicando talvez o porquê de alguns pacientes asmáticos apresentarem perda parcial e irreversível da função respiratória ao longo do tempo. Episódios repetidos de inflamação podem levar ao remodelamento de vias aéreas, contribuindo para a não reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar. A este processo dá-se o nome remodelamento

brônquico (Cohn et al., 2004; James, 2005). O processo de remodelamento das vias aéreas parece ser causado pela repetida agressão ao epitélio decorrente do processo inflamatório crônico e é caracterizado por aumento de células caliciformes, de glândulas submucosas, do número de vasos e do número de células do músculo liso. Além disso, ocorre também espessamento da membrana basal com deposição de fibras colágenas e elásticas e alterações subepiteliais da matriz extracelular (Black, 2004; Hirst et al., 2004).

Atualmente, uma série de evidências sugere que o processo de remodelamento não ocorre somente em vias aéreas, mas também no parênquima pulmonar. A inflamação distal tem papel crucial na hiperresponsividade, na asma noturna e exacerbações (Calhoun, 2003). Acredita-se que os eosinófilos possam ter um papel fundamental por causar lesão epitelial e estimular a fibrogênese através da produção de TGF- β , citocina que regula a produção de colágeno (NHL, 1997). Além deles, os mastócitos podem produzir citocinas, como TNF- α , IL-4, FGF (fator de crescimento fibroblástico), que influenciam a proliferação fibroblástica e atuam na digestão da matriz extracelular.

Os linfócitos possuem efeito regulatório sobre a fibrose e sobre a inflamação. Os macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que podem degradar componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios, potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (Tillie-Leblond et al., 2005). As vias aéreas distais e o parênquima pulmonar podem produzir muitas citocinas de perfil Th2, quimiocinas e mediadores que estão envolvidos na iniciação e na perpetuação do processo

inflamatório (Leick et al, 2004; Souza et al., 2013; Pigati et al., 2015). Os resultados encontrados de um estudo de biopsias de pulmões de asmáticos foram que os fibroblastos das vias aéreas são morfologicamente distintos dos fibroblastos do parênquima pulmonar. (Miyahara et al., 2004)

A inflamação das vias aéreas é orquestrada principalmente por células T CD4⁺ através do tipo-2 de citocinas (Larche, 2003). No entanto, as células T CD8⁺ também podem se diferenciar em tipo-2, produtoras de citocinas de células semelhantes a células T CD4⁺ e o seu papel na patogênese da asma pode estar envolvido no desenvolvimento e a manutenção da hiperresponsividade de vias aéreas (Woodland, 2003 e Miyahara et al., 2004). Estudos evidenciam expressão local de citocinas do tipo 2 (IL-4) por células T CD8⁺ em vias aéreas asmáticas (Ying, 1997). Em um estudo de acompanhamento de curto prazo, as células T CD8 foram associados com o declínio da função pulmonar na asma (van Rensen, 2005), e os pacientes que morreram durante uma crise de asma grave tinham células T CD8⁺ ultrapassando células T CD4⁺, tanto proximal quanto distal em vias aéreas (Faul, 1997).

Resumidamente a inflamação é guiada pela subclasse específica de linfócitos T conhecida como linfócitos Th2, que controlam e perpetuam a inflamação e o remodelamento, por intermédio da secreção de citocinas específicas, principalmente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Renauld, 2001). Há uma seletiva retenção de células T nas vias aéreas, expressão de moléculas de adesão e a liberação de vários mediadores inflamatórios com recrutamento e ativação de células inflamatórias. Após 24 horas desta exposição alérgica ocorre um aumento na expressão de RNA mensageiro para IL-2, IL-5 e GM-CSF em

biópsia brônquica de pacientes asmáticos (Liu, 2002; Wenzel, 2003; Robinson, 2004; Smith, 2005).

Linfócitos CD8⁺ podem produzir fatores citolíticos para eliminar as células infectadas, mas esses fatores também podem danificar o epitélio das vias aéreas, o que, em seguida, expõe as terminações nervosas da submucosa a estímulos nocivos que desencadeiam a asma (Dakhama, 2013).

Sabe-se que a porção distal do pulmão contribui para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (Yanai et al., 1992; Wagner et al., 1998). Previamente achava-se que esta região, antes conhecida como “zona silenciosa”, contribuiria somente com 10% do valor total de resistência ao fluxo aéreo pulmonar. Entretanto, as novas tecnologias permitiram demonstrar que há alterações estruturais e inflamatórias no parênquima pulmonar distal que são similares às observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Lanças et al., 2006). É importante considerar que o volume total e a área de superfície das vias aéreas distais são muito maiores que o volume e a área de superfície das grandes vias aéreas, sugerindo que o desenvolvimento de qualquer alteração no pulmão distal em pacientes asmáticos tem um efeito mais dramático sobre a patogênese e o tratamento da doença (Tulic e Hamid, 2003, Angeli et al, 2008 e Satrling et al, 2009).

Desta forma, tem sido proposto que o pulmão periférico, considerado como as vias aéreas de calibre menor ou igual a dois milímetros de diâmetro, e o parênquima pulmonar adjacente podem ter um papel fundamental na resistência pulmonar total, atentando para a possibilidade da participação também do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que

provavelmente altera a forma de pensar sobre o tratamento da doença, uma vez que os esteróides inalatórios mais usados atualmente apresentam sua deposição principalmente nas vias aéreas centrais e não na periferia pulmonar (Bachofen, 1966; Tulic e Hamid, 2003).

Alguns autores já demonstraram aumento no número de células T (CD3), eosinófilos totais, eosinófilos ativados, assim como aumento na expressão de mRNA positivo para IL-5 e IL-4 nas vias aéreas distais de pulmões ressecados de indivíduos asmáticos comparativamente aos indivíduos normais (Hamid et al., 1997, Minshall et al., 1998). A decorina, biglicano e lumican pertencem a uma pequena família dos proteoglicanos ricos em leucinas. Estes proteoglicanos são capazes de ligar-se as fibras colágenas e interferir na sua estrutura, função e síntese. Estas moléculas também se ligam a diferentes fatores de crescimento, como TGF- β e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), influenciando sua biodisponibilidade e modulando sua capacidade de influenciar a proliferação celular e a deposição na matriz extracelular (Ludwig, 2007).

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

actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e membrana plasmática por estruturas conhecidas como corpos densos e placas densas, o miócito se contrai (Sylvester, 2004).

Os mecanismos independentes de Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e contração do músculo liso são conhecidos como sensibilização do Ca^{2+} (Chiba e Misawa, 2004; Sylvester, 2004). Os mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que uma das principais vias envolvidas neste processo é a via RhoA/Rho-quinase (Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010). A Rho-quinase ativada interfere com o equilíbrio entre as atividades da miosinoquinase e a miosinofosfatase, fosforilando e consequentemente inativando a subunidade de ligação da miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006). Como a miosinofosfatase remove fosfato da CLM fosforilada para induzir o relaxamento muscular (Chiba et al., 2010), a inibição de sua atividade pela Rho-quinase promove o estado fosforilado da CLM e contribui para um aumentado nível de contração (Schaafsma et al., 2004; Chiba et al., 2010).

Figura 1. Esquema ilustrativo do mecanismo fisiopatológico da asma envolvendo as diversas interações celulares e mediadores inflamatórios, conduzindo ao remodelamento brônquico independentemente do perfil Th2 ou não Th2 (Adaptado de Cohn L. et al., 2004)

Figura 2. Patogênese da asma alérgica. O antígeno inalado é processado pelas células dendríticas e apresentado para as células Th0 CD4+. As células B são estimuladas pelas células Th0 CD4+ e pelas células T natural killer (NKT) a produzirem IgE. A IgE então secretada liga-se aos mastócitos existentes no parênquima pulmonar. O antígeno inalado liga-se à IgE, estimulando a desgranulação do mastócito, e este, por sua vez, libera os mediadores da resposta imediata e da resposta tardia. A histamina e os leucotrienos produzem broncoespasmo e edema de vias aéreas. Os fatores quimiotáticos liberados, aliados aos fatores liberados pelas células Th2 CD4+, facilitam o trânsito dos eosinófilos desde a medula óssea até as paredes das vias aéreas. Foi proposto que esta resposta tardia, aliada aos mediadores liberados pelas células NKT e Th2 CD4+, resultam na produção excessiva de muco, inflamação na parede das vias aéreas, lesão e hiper-reatividade. GM-CSF = fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; IL = interleucina. (Adaptado de Cohn L. et al., 2004)

1.4. FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFkB

Descoberto em 1986, o NFkB é um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve que das moléculas de anticorpo das células B (kB) (Chen et al.,1999).

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

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

O fator de transcrição NFkB é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos,

apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados (Xiao, 2004). Essa superioridade deve-se aos variados estímulos que o ativam, tais como: neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, vírus e bactérias, óxido nítrico sintase induzida e a ciclooxigenase tipo 2 (O'Neil, 1997).

Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NFκB. Quando não estimulado, o fator NFκB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o IκB. Esse complexo impede a translocação do NFκB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do IκB (Figura 4) são necessárias para que ocorra a translocação (Tripathi, Aggarwal, 2006).

De acordo com Gagliardo et al. (2003), a ativação exagerada de NFκB perpetua a produção de mediadores inflamatórios em asma grave. Existem um ou mais locais para a ligação de NFκB, proteínas que são reguladas positivamente na asma, tais como IL-1, a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), e iNOS (Hiscott et al., 1993).

Segundo Jadhav et al. (2006), independente do estímulo parece haver participação do estresse oxidativo e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NFκB. Quando não estimulado, o fator NFκB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (IκB). Esse complexo impede a translocação do NFκB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do IκB são necessárias para que ocorra a translocação.

Figura 3. Esquema representativo mostrando a translocação do NFκB para o núcleo (Adaptado de Xiao, 2004).

1.5. REMODELAMENTO

Além da inflamação eosinofílica das vias aéreas, as características fisiopatológicas da asma incluem mudanças estruturais conceituadas como remodelamento (Sagiani, Lloyd 2015). Essas alterações consistem em aumento da espessura da membrana basal reticular subepitelial (RBM), aumento da espessura do músculo liso das vias aéreas (ASM), angiogênese e hiperplasia de células caliciformes que estão associados a uma perda irreversível da função pulmonar (Tai et al. 2014).

Remodelamento das vias aéreas está relacionado com o decréscimo da função pulmonar observada em pacientes asmáticos (Kariyawasam et al., 2007; Kermode et al., 2011; Grainge et al., 2011) e principalmente na população asmática grave (James et al. 2012; Bittar et al. 2015). Na clínica, o remodelamento pulmonar leva a uma diminuição da resposta terapêutica farmacológica e ou agravamento progressivo dos sintomas no decorrer da evolução da doença (Stuart et al. 2000; Kaminska et al. 2009; Chakir et al. 2013).

Pacientes com asma apresentam alterações estruturais que podem comprometer a função pulmonar e o remodelamento ocupa lugar de destaque. Os principais achados histopatológicos em pacientes asmáticos são a diminuição da luz das vias aéreas por fibrose subepitelial, aumento da espessura do músculo liso da via aérea e hiperplasia de células produtoras de muco (Elias, 2000; Kaminska et al. 2009; Shifreen et al. 2012).

Modelos experimentais de asma alérgica crônica em camundongos e cobaias mostram a existência de aumento da produção de colágeno, hipertrofia e hiperplasia das vias aéreas e aumento da produção de muco (Prado et al. 2006; Angeli et al. 2008; Arantes-Costa et al. 2008; Toledo et al. 2013; Righetti et al. 2014). Contudo, acreditamos que o modelo animal de inflamação alérgica crônica é útil para esclarecer os mecanismos reguladores do remodelamento pulmonar na asma.

As vias aéreas distais e o parênquima pulmonar podem produzir muitas citocinas de perfil Th2, quimiocinas e mediadores que estão envolvidos na iniciação e na perpetuação do processo inflamatório. (Nakamura et al. 1999; Benayoun et al. 2003; Manuyakorn et al. 2013). Os resultados encontrados de um estudo de biopsias de pulmões de asmáticos mostraram que os fibroblastos das vias aéreas são morfologicamente distintos dos fibroblastos do parênquima pulmonar. Os fibroblastos do parênquima distal são mais largos, com aparência estrelada e com mais projeções citoplasmáticas e os fibroblastos das vias aéreas sintetizam mais pró-colágeno tipo I após estímulo com TGF- β (Kotaru et al., 2006). Este estudo sugere que dois tipos de fibroblastos existem no pulmão. Estas diferenças estruturais podem explicar, pelo menos parcialmente, frente a um estímulo lesivo, a diversidade de resposta de reparação observada em vias

aéreas proximais e distais no pulmão e no parênquima de pacientes asmáticos e com outras doenças respiratórias.

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

A espessura da membrana basal reticular na asma é determinada pela proporção de deposição em curso e degradação de proteínas, incluindo colágeno I, III e V, fibronectina, tenascina, lumican e biglican. Esses componentes são provavelmente secretados pela ativação de fibroblastos e miofibroblastos, principalmente por causa da sinalização do TGF- β (Redington et al. 1997; Michalik et al. 2009). As fibras colágenas são os elementos mais abundantes da MEC no pulmão, constituindo aproximadamente 70% do interstício pulmonar (Turino 1985). Qualquer alteração na estrutura, quantidade ou na geometria de sua distribuição, pode desencadear alterações na função pulmonar (Laurent, 1986).

Os principais componentes da matriz extracelular pulmonar (MEC) são as fibras elásticas, colágenas, os proteoglicanos, as glicoproteínas e as metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMPs) (Holgate, 2000; Manuyakorn, 2013). Os macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteinases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que podem degradar componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários

mediadores inflamatórios, potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (Tillie-Leblond et al., 2005).

As metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMPs), em situações de desequilíbrio contribuem para o dano tecidual e algumas das características do remodelamento observadas na asma (Vignola, 2003). São produzidas por células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Katarzyna et al. 2016) e tem relação com citocinas Th2 e também com Th17 (Chesn et al. 2014).

1.6. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA ASMA

As citocinas podem ser produzidas por diversos tipos de células inflamatórias, tais como linfócitos T, mastócitos, eosinófilos, células estruturais, incluindo células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (Hamid and Tulic 2009; Miotto et al. 2001).

As citocinas estão envolvidas na sinalização célula a célula, crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose. As ações das citocinas são mediadas por receptores específicos 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 próprias células que as produzem (Hamid and Tulic 2009).

Foram identificados mais de 30 citocinas envolvidas na fisiopatogenia da asma. Dentre elas estão as derivadas de células T, tais como as células Th1 (IL-2, IFN- γ e IL-12), células Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25), citocinas T regulatórias ou Th3 (IL-10 e TGF- β) e células Th17 (IL-17). Existem outras classes de citocinas: as pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-11, TNF- α), as anti-

inflamatórias (IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-18), fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , FGF, EGF) e as quimiocinas (RANTES, IL-8) (Hamid and Tulic 2009; GINA, 2017).

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

A IL-4 perpetua a produção de IgE e consequentemente, os eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5 especificamente recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendelees, Asmus and Chesrown 2004; Lemanske and Busse 2010).

A IL-13 pode ser produzida por células epiteliais, musculares lisas, fibroblastos e monócitos/macrófagos e pode induzir características patológicas da asma, independentemente das tradicionais células efetoras, tais como mastócitos e eosinófilos. Estas células podem contribuir para a perpetuação da resposta alérgica, podendo fornecer uma explicação para a cronicidade da doença. A IL-13 desempenha importantes papéis na inflamação das vias aéreas, na fibrose subepitelial, na hipersecreção de muco, na hiperresponsividade brônquica e na diminuição de metaloproteases (Wills-Karp 2004).

E mais recentemente tem-se observado a importância das citocinas de perfil Th17. A IL-17 tem sido associada ao aumento da produção de muco, remodelamento das vias aéreas, exacerbações recorrentes (Aujla and Alcorn 2011), infiltrado neutrofílico (McKinley et al. 2008; Miossec and Kolls 2012; Miossec, Korn and Kuchroo 2009) e infiltrado eosinofílico (Choy et al. 2015; Dias and Banerjee 2013). Além disso, a IL-17 também pode induzir aumento da

resistência ao tratamento com corticosteroide (McKinley et al. 2008; Zijlstra et al. 2012).

Figura 4. Esquema ilustrativo do mecanismo fisiopatológico da asma envolvendo diversas células e mediadores inflamatórios. As respostas alérgicas são predominantemente de perfil Th2 e envolvem, principalmente, as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Adaptado do GINA, 2017).

1.7. ESTRESSE OXIDATIVO

No trato respiratório o óxido nítrico (NO) é produzido por uma ampla variedade de células, incluindo células epiteliais, nervos, células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos) e células endoteliais vasculares (Ricciardolo, 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). 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.

As óxido nítrico sintase (NOS) são as enzimas responsáveis por catalisar a formação de óxido nítrico através da conversão enzimática do aminoácido arginina em citrulina (Kharitonov et al. 1994; 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, Dweik, 2008; Rodway et al. 2009). As isoformas constitutivas estão envolvidas na vasodilatação e broncodilatação. A produção de iNOS é estimulada por muitas citocinas pró-inflamatórias e é expressa em alguns tipos de células inflamatórias (Ricciardolo et al. 2004; Prado et al., 2005b).

O NO parece atuar em vários mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam as alterações funcionais e histopatológicas encontradas em pacientes com doenças inflamatórias pulmonares, sendo que a sua contribuição depende principalmente da enzima pela qual foi produzido. Barnes (1996) sugere que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma

por causar relaxamento na musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC. No entanto, o NO derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação nas arteríolas, com consequente extravasamento de plasma e edema. A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS pode resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th1/Th2 contribuindo para os sinais e sintomas da doença. (Prado et al, 2006)

Resultados de nosso grupo de pesquisa demonstraram a importante participação do óxido nítrico no modelo de asma experimental em cobaias. Prado et al. (2005a) demonstraram que existe um aumento da expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presentes nas vias aéreas distais de animais sensibilizados. Observaram ainda que a isoforma nNOS, embora constitutiva, encontra-se presente em células inflamatórias (linfomononucleares e eosinófilos) e o número de células que expressam esta isoforma é maior nos animais sensibilizados com ovoalbumina (Prado et al. 2003; Angeli et L. 2008; Prado et al. 2008; Righetti et al. 2014; Pigati et al. 2015). Prado et al. (2005b) verificaram que a inibição crônica de NO alterou particularmente os valores de resistência basal e após desafio antigênico. Por outro lado, a inibição aguda da produção de NO alterou principalmente os valores de elastância do sistema respiratório nos animais sensibilizados, sugerindo efeito broncodilatador do NO em vias aéreas distais.

Vários estudos de nosso grupo de pesquisa já demonstraram associação entre inflamação pulmonar alérgica crônica e aumento de óxido nítrico exalado e da expressão de iNOS (tanto em vias aéreas quanto parênquima pulmonar) no modelo de asma experimental em cobaias (Angeli et al., 2008; Nakashima et al.,

2008; Ruiz-Schütz et al., 2008; Starling et al., 2009; Prado et al., 2011; Marques et al., 2012; Possa et al., 2012). Embora o NO por si mesmo não seja inerentemente citotóxico, ele pode agir como um agente citotóxico ou citoprotetor, dependendo das condições intracelulares.

Nas vias aéreas, o estresse oxidativo está relacionado a contração da musculatura lisa (Rhoden et al., 1989), indução da hiperresponsividade de vias aéreas (Katsumata et al., 1990), hipersecreção brônquica (Doelman et al., 1990), lesão epitelial e a exsudação vascular (Del Maestro et al., 1981), apresentando um importante papel na fisiopatologia da asma (Doelman et al., 1990). 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).

Ao longo dos anos, inúmeros estudos em humanos e modelos animais (Meurs et al., 2002; Zimmermann et al., 2003; Morris et al., 2004; Maarsingh et al., 2006, 2008a, b, 2009a, b, 2011; Lara et al., 2008; North et al., 2009; Vonk et al., 2010; Aristóteles et al. 2013; Pera et al. 2014) que usaram diferentes antígenos em várias espécies e variedades, o aumento da atividade e / ou expressão da arginase também tem sido demonstrado, indicando seu papel na fisiopatologia da asma. Classicamente, a arginase é a enzima que atua no ciclo hepático da uréia. No entanto, já foi observada em outras células do organismo que não expressam um ciclo completo da uréia, incluindo o pulmão (Que et al., 1998; Meurs et al., 2003).

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). Entretanto, as células inflamatórias dos asmáticos possuem uma capacidade aumentada de gerar radicais livres quando comparadas com controles, os quais posteriormente contribuem para altas concentrações de compostos reativos nitrogenados (Jarjour, Calhoun, 1994), o que pode causar efeitos deletérios. Quando as vias aéreas são expostas ao estresse oxidativo, o peroxinitrito (ONOO), um dos potentes oxidantes formados pela reação entre NO e oxigênio, é responsável por várias alterações, cabendo ressaltar a lesão ao DNA, estímulo à degradação de lipídeos, proteínas e carboidratos, as quais podem alterar as funções celulares e potencializar as respostas inflamatórias.

O NO pode também ser convertido em nitrato, capaz de oxidar proteínas e contribuir para o estresse oxidativo. Isto pode ocorrer por intermédio da nitração da tirosina, em uma reação catalisada pela peroxidase eosinofílica (Wu et al. 1998). Elevados níveis de nitrotirosina foram observados em asmáticos (Hanazawa et al. 2000). Quantidades excessivas de ROS e RNS, que são produzidas pelos asmáticos podem exceder as defesas antioxidantes e causar estresse oxidativo (Hanazawa et al. 2000). Além disso, ROS pode induzir a produção de citocinas e quimiocinas por intermédio da produção do fator nuclear NFκB, em células epiteliais brônquicas (Biagioli et al. 1999).

Os isoprostanos participam de diferentes funções biológicas e são responsáveis pela mediação de certos aspectos da lesão oxidativa (Milne et al., 2007). 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 no sangue, 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 15F2t-isoprostano (anteriormente chamado PGF2 α) é o melhor caracterizado (Lawson et al., 1999). O 15F2t-isoprostano é um isômero de PGF2 α com efeitos contráteis através de ligação a receptores tromboxanos A₂ no músculo liso das vias aéreas (Janssen et al., 2000). Além disso, este agente causa aumento da resistência pulmonar, indicando que o 15F2t-isoprostano, 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).

1.8. ASMA GRAVE E TRATAMENTOS

Dependendo da gravidade do quadro asmático é escolhido um tratamento frente as opções terapêuticas disponíveis para essa doença, incluindo corticosteroides inalatórios e sistêmicos. Apesar dos inúmeros tratamentos, não há um controle adequado dos sintomas e muitos efeitos colaterais são observados (GINA, 2017).

Os corticosteroides podem ser administrados por via inalatória, oral ou parenteral. O seu uso está associado a diversos efeitos colaterais locais e sistêmicos. Os efeitos adversos atribuídos ao uso da inalação incluem candidíase orofaríngea, tosse por irritação, disfonia, supressão adrenal e diminuição da densidade óssea. Os efeitos sistêmicos consequentes da administração oral ou parenteral incluem diabetes, hipertensão arterial, osteoporose, supressão hipotalâmica-pituitária-adrenérgica, obesidade, catarata, glaucoma, fraqueza muscular e estria cutânea (GINA, 2017).

Quando os sintomas iniciais se agravam de forma a provocar limitações físicas e obstrução persistente do fluxo aéreo, com valores abaixo de 60% do predito para o volume expiratório forçado no primeiro segundo do pico de fluxo expiratório, a asma é considerada de difícil controle (Royce et al., 2012).

Dentre as mudanças estruturais que ocorrem na asma grave, está o remodelamento das vias aéreas, que ocorre devido ao processo inflamatório crônico, onde as metaloproteases (principalmente a MMP-9) possuem grande atuação (Mattos et al., 2002). O remodelamento está associado a pior prognóstico clínico e risco de morbidade e mortalidade (Bergeron et al., 2010).

Atualmente os corticosteroides formam a base do tratamento da asma, atuando como eficazes anti-inflamatórios, porém seus efeitos sobre o remodelamento ainda não foram totalmente elucidados (Bergeron et al., 2010). Em altas doses, causam efeitos adversos, embora, paradoxalmente, a hiperresponsividade ao estímulo direto continue existindo (Brannan, 2010).

De acordo com Mattos et al. (2002), a expressão e a atividade da MMP-9 não foi alterada após tratamento com corticosteroides inalatórios em pacientes com asma leve. Alguns estudos demonstraram que o uso de corticosteroides inalatórios, quando administrados em crianças filhas de pais asmáticos e atópicos, durante 1 a 4 anos, não obteve efeito sobre a história natural da asma (Bisgaard et al., 2006; Guilbert et al., 2006; Murray et al., 2006). Em outros estudos que utilizaram corticosteroides inalatórios durante períodos prolongados, em crianças mais velhas, também não foi observada influência no curso da doença (Holgate, 2008).

Outras terapias são utilizadas no tratamento da asma como os moduladores de leucotrienos, que apresentam propriedades anti-inflamatórias e

são eficazes para a resposta asmática precoce e tardia, assim como os agentes anticolinérgicos (Dykewicz, 2001; Perry et al., 2004), não sendo, porém, tão efetivos no influxo linfocitário (Leick-maldonado et al., 2004). Não se mostrando, assim, bem-sucedido no controle total da doença.

Portanto, a busca por novas terapias eficazes para o tratamento da asma se faz necessária e de alta prioridade, principalmente para aqueles indivíduos asmáticos cujos sintomas não são bem controlados pelas medicações disponíveis atualmente (Papaioannou et al., 2015).

Há ainda, a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas que sejam capazes de reverter e prevenir o remodelamento na asma, pois como observado, os corticosteroides não atuam diretamente nas alterações estruturais das vias aéreas (Royce et al., 2012).

Outros agentes farmacêuticos foram testados quanto à habilidade de promover controle prolongado da asma e reduzir a necessidade de uso de corticosteroides. Estes agentes incluem o metotrexato, receptor solúvel de IL-4, anti-IL-5 e IL-12 recombinante, assim como o omalizumabe, um anticorpo monoclonal/ anti-IgE, que se liga a IgE circulante, porém é incapaz de se ligar ao anticorpo ligado à célula, impossibilitando a indução de anafilaxia pela terapia.

O omalizumabe é administrado via subcutânea bissemanal ou mensalmente, com base nos valores de níveis séricos de IgE e índice de massa corporal (IMC). Uma vez iniciada a terapia, os níveis de IgE aumentam em consequência da formação de um complexo IgE/anti-IgE. Foi demonstrado que esta terapia diminui as exacerbações asmáticas e a dosagem de glicocorticoides necessárias para o controle dos sintomas. Estudos sugerem que os pacientes que necessitam de doses altas de glicocorticoides inalatórios são os que

apresentam melhor resposta ao tratamento com omalizumabe (Busse, WW, 2001, Bousquet, J et al., 2004)

Uma pesquisa agrupando 7 estudos envolvendo mais de 4.000 pacientes com asma grave persistente indicaram que o omalizumabe diminuiu o risco de exacerbações asmáticas em 38%, bem como o índice de atendimentos em pronto socorro em 47% (Bousquet, J, et al., 2005)

As diretrizes NAEPP recomendam que o omalizumabe seja considerado uma terapia auxiliar para pacientes com asma grave persistente inadequadamente controlada por corticosteroides e beta-agonistas de longa ação (GINA, 2017).

A imunoterapia para asma ainda é controversa (Adkinson NF Jr, 2001; Bousquet J et al., 2001), pois envolve a administração repetida de um alérgeno em concentrações gradativamente maiores, com o objetivo de diminuir a sensibilidade a este alérgeno. Foi claramente demonstrado que a imunoterapia é efetiva em casos de rinite alérgica e, portanto, também pode ser efetiva no tratamento de alguns pacientes com tipos específicos de asma alérgica (Calamita, Z et al., 2006).

1.8.1. INIBIÇÃO DA RHO-QUINASE

A proteína Rho, pertencente à família das GTPases parece exercer regulação em diversas atividades celulares, tais como quimiotaxia, adesão e controle no crescimento e migração celular. Para todas estas atividades a proteína Rho possui uma proteína efetora denominada Rho-quinase (Fukata et al., 2001; Henry et al., 2005; Taki et al., 2007).

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

Quanto à musculatura lisa, seu tônus é regulado primeiramente pela fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) por mecanismos que podem ou não depender das concentrações citoplasmáticas de cálcio (Ca^{2+}). Um aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} conduz a formação do complexo calmodulina que ativa a mioquinase e a fosforilação desta proteína resulta na contração na musculatura lisa (Kamm et al., 1985). Por outro lado, a fosforilação da CLM também pode ocorrer quando ocorre a inibição da miofosfatase, atuando no aumento da fosforilação da CLM, independente das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} (Kitazawa et al., 1991).

A utilização do Ca^{2+} para a fosforilação da MLC e consequentemente gerar a contração da musculatura lisa é denominada como “sensibilização do Ca^{2+} ” (Kitazawa et al., 1988; Bradley et al., 1991). Os mecanismos que servem de base para esta sensibilização do Ca^{2+} ainda não estão totalmente claros, mas a via Rho/Rho-quinase parece estar envolvida neste processo, atuando como inibidores da miofosfatase (Gong et al., 1996; Kureishi et al., 1977; Hirata et al., 1991).

As duas formas de expressão da Rho-quinase, chamadas de ROCK-1 e ROCK-2, inibem a atividade da miofosfatase e promovem a atividade da mioquinase, aumentando a fosforilação e resultando no aumento do tônus muscular (Fu et al., 1998; Ishizaki et al., 2000; Uehata et al., 1997; Kureishi et

al., 1997). Portanto, podemos inferir que se houver o bloqueio da sinalização da Rho por meio da Rho-quinase, poderíamos esperar que as respostas contráteis do músculo liso fossem atenuadas por meio do mecanismo de inibição da miofosfatase.

Taki et al. (2007), administraram oralmente o fasudil, um inibidor específico da Rho-quinase, também a ratos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e evidenciaram que o número de células totais e eosinófilos no lavado broncoalveolar foram significativamente atenuados de uma forma dose-dependente. O fasudil causou inibição nos aumentados níveis de IL-5, IL-13 e eotaxina no lavado broncoalveolar. Além disso, o inibidor da Rho-quinase foi capaz de suprimir a hiperplasia celular, a infiltração de células inflamatórias e a responsividade à metacolina. Mas cabe ressaltar que os modelos experimentais utilizados neste estudo não apresentam uma resposta inflamatória crônica de vias aéreas e de parênquima pulmonar, sendo na verdade modelos de sensibilização com avaliação da resposta imediata ao desafio antigênico.

Em relação ao remodelamento das vias aéreas, a Rho-quinase está envolvida na proliferação de miócitos e parece ter um papel no desenvolvimento de fibrose e na migração de células musculares lisas das vias aéreas e fibroblastos. Todas essas ações contribuem para o remodelamento tecidual (Fernandes et al., 2007). No entanto, não há estudos com modelos experimentais de inflamação alérgica crônica associada a presença de remodelamento da matriz extracelular nos quais tenha sido avaliado o efeito do tratamento com este grupo de drogas.

No estudo de Ming et al. (2002), uma ligação da Rho-quinase com a eNOS foi demonstrada no próprio local onde está ocorrendo o espasmo e evidenciou

que a inibição da via Rho/Rho-quinase conduz a uma rápida fosforilação da eNOS, sugerindo um tipo regulação inversa na expressão da eNOS. Portanto, quando houver uma menor expressão de Rho e Rho-quinase, consequentemente vai ocorrer uma maior expressão de eNOS seguidos de uma vasodilatação de arteríolas e edema, contribuindo para a fisiopatologia da asma. É importante ressaltar que a inibição da iNOS (com o tratamento com 1400W) e de todas as óxido nítrico sintases (com o tratamento com L-NAME) é capaz de reduzir a resposta constritora de vias aéreas e parênquima pulmonar desencadeadas pelo desafio com antígeno. Acredita-se que parte destes efeitos possam ser decorrentes da inibição da Rho-quinase (Takemoto et al., 2002; Bolz et al., 2003; Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

Quanto à neuromodulação, o papel da Rho-quinase também parece ser relevante, embora não esteja totalmente elucidado. Como se sabe, o tônus das vias aéreas é principalmente controlado pelos nervos parassimpáticos e pelo sistema NANC (não adrenérgico-não colinérgico), havendo um aumento na liberação de mediadores destes em pulmões com inflamação alérgica crônica (Tibério et al., 1997, GINA, 2017). Dados recentes evidenciam que o inibidor da Rho-quinase diminui a liberação de acetilcolina dos nervos colinérgicos, indicando que a Rho-quinase está envolvida nas respostas mediadas por estes nervos (Fernandes et al., 2007).

Há evidências da utilização de um derivado da piridina (Y-27632) como um inibidor seletivo da família da Rho-quinase, atuando na diminuição da pressão sanguínea do rato e no relaxamento da musculatura lisa da aorta de coelhos e na traqueia de cobaias (Kimura et al., 1996; Uehata et al., 1997; Nakahata et al., 2000). Além disso, alguns estudos mostraram que o Y-27632

relaxa a musculatura lisa dos brônquios e das artérias pulmonares de humanos (Yoshii et al., 1999; Yamagata et al., 2000), podendo sugerir a sua utilização no controle da sinalização do sistema Rho/Rho-quinase como tratamento para a resposta de hiperresponsividade brônquica encontrada na exacerbação da asma (Johnston et al., 1995; Sigurs et al., 1995; Rakes et al., 1999; Fernandes et al., 2007).

Foi recentemente demonstrado que a inibição da Rho-quinase específica pelo Y-27632 está associada com a redução no recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas e no parênquima pulmonar em cobaias com inflamação alérgica pulmonar crônica, além de contribuir para a redução do processo de remodelamento, demonstrando menor conteúdo de colágeno e fibras elásticas nas paredes das vias aéreas e tecido pulmonar (Possa et al., 2012; e Righetti et al., 2014).

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

Figura 6. Estrutura do inibidor Y-27632 (Adaptado de Breitenlechner et al., 2003).

1.8.2. INIBIÇÃO DO NFκB

O CAPE, também denominado como feniletil cafeato ou fenetil cafeato, tem sua fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_4$. É um dos componentes bioativos da própolis (produto natural secretado pelas abelhas) e seu potencial terapêutico para o tratamento de diferentes doenças têm sido demonstrados. É um potente sequestrador de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibidor do sistema xantina-xantina oxidase e da lipoxigenase (MURTAZA et al., 2014).

A produção excessiva de ROS pode reagir com macromoléculas, como o DNA, resultando em respostas prejudiciais ao organismo. Várias pesquisas foram feitas para avaliar o papel antioxidante do CAPE (Russo et al 2002, Ma et al., 2016). As evidências mostram que o CAPE é um potente antioxidante que pode sequestrar as ROS e proteger a membrana celular contra a peroxidação lipídica (Yasui et al, 2013).

Além disso, o CAPE inibe a ativação do fator de transcrição de NFκB, inibindo a produção da ciclooxigenase (COX), que confere a este composto múltiplas atividades imunomodulatórias e antiinflamatórias. Estudos mostram que o CAPE inibe a expressão do gene associado à enzima óxido nítrico sintase (iNOS), reduzindo sua atividade (Yasui et al, 2013).

Estudos já haviam demonstrado a ação inibidora do CAPE na liberação do ácido araquidônico da membrana celular, com consequente na inibição da produção de COX-2 e COX-1. A inibição de iNOS pelo CAPE ocorre devido ao bloqueio do NFκB e, da produção de NO induzida pelo IFN-γ. Também foi demonstrado que o CAPE é capaz de suprimir a ativação do gene responsável para expressão COX-2 (MURTAZA et al., 2014). Também observaram a inibição

da transcrição do gene da interleucina IL-2 e a síntese de IL-2 por CAPE em células T estimuladas.

Os estudos demonstraram que o CAPE possui atividade neuroprotetiva (Wei et al., 2008). O CAPE pode induzir a apoptose em células de grânulos cerebelares e reduzir a lesão cerebral provocada por isquemia/reperfusão da medula espinhal. (Amodio et al., 2003).

Alguns outros estudos mostram o efeito do CAPE como imunomodulador anti-hepatotóxico, anti-osteogênico e antiaterosclerótico. (MURTAZA et al., 2014). Além disso, Ucan et al. propuseram o efeito do CAPE na cicatrização óssea em um modelo de rato (Ucan et al., 2013) A citotoxicidade do CAPE está diretamente relacionado ao seu efeito apoptótico.

Não há estudos avaliando o efeito do CAPE em modelos experimentais de inflamação alérgica crônica, assim como a comparação desse tratamento com outras opções terapêuticas.

Figura 7. Estrutura química do éster fenílico do ácido cafeico (CAPE), o inibidor de NFκB (Adaptado de Bonuccelli G et al., 2017)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo visou avaliar os efeitos dos tratamentos com dexametasona, os inibidores da Rho-quinase e de NF κ B em vias aéreas e septos alveolares de camundongos com inflamação alérgica crônica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram avaliados:

1. Hiperresponsividade à metacolina;
2. NO exalado (NOex)
3. O fluido do lavado broncoalveolar
4. Nas vias aéreas e nos septos alveolares foram quantificados:
 - a) O infiltrado eosinofílico
 - b) Resposta de remodelamento: fração de volume de fibras colágenas e actina, bem como as células positivas para TIMP-1, TGF- β e MMP-9;
 - c) A resposta de estresse oxidativo: iNOS e fração de volume de PGF-2 alfa;

d) O número de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 IFN- γ , ROCK-2, células dendríticas, CD4⁺ e CD8⁺

e) O número de células positivas para NF κ B;

5. Quantificação de IgE, IgG1, IgG2A

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo nº 019/16).

Foram utilizados 60 camundongos machos BALB/c provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985). Em média, o peso corporal dos animais foi de aproximadamente 20-25g no início do protocolo de sensibilização.

Os animais foram descartados segundo normas estabelecidas nesta Faculdade de Medicina da USP, pelo Grupo Técnico de Resíduos, como relatado abaixo:

A FMUSP gera resíduos dos grupos A, B, C, D e E classificados pelas Legislações ANVISA e CONAMA.

As carcaças dos animais utilizadas em pesquisa e ensino fazem parte do grupo A. Após sua segregação e identificação, o gerador solicita a retirada pelo sistema “disque carcaça”. Todas as carcaças são relacionadas e acondicionadas em câmara fria no Abrigo de Resíduos; o veterinário responsável emite o laudo e documento de Movimentação de Transporte de Resíduos – MTR liberando as carcaças para recolhimento, que ocorre três vezes por semana pela LIMPURB, para tratamento e disposição final.

3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica:

A) Grupo SAL: inalações com soro fisiológico (SF) estéril (n°= 6);

B) Grupo OVA: inalações com solução de ovoalbumina (OVA) (n°= 6);

C) Grupo OVA-RHO: inalações com solução de ovoalbumina (OVA) e tratamento com o inibidor da Rho-quinase (n°= 6);

D) Grupo OVA-CORT: inalações com solução de ovoalbumina (OVA) e tratamento com corticosteroide (dexametasona) (n°= 6);

E) Grupo OVA-CAPE: inalações com solução de ovoalbumina (OVA) e tratamento com o inibidor do NFκB (n°= 6);

Todos os grupos foram repetidos duas vezes para permitir a realização de todas as técnicas descritas na sequência.

3.2. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

Para produzir o modelo de inflamação pulmonar foi injetado um antígeno (ovoalbumina) via intraperitoneal para induzir uma sensibilização sistêmica e o mesmo antígeno foi administrado pelas vias aéreas, o foco do processo inflamatório, por aerossol. O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve a duração de 28 dias. Os camundongos receberam solução de 50 mg de ovoalbumina (Sigma - Aldrich) e 6 mg de

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

3.2.1. TRATAMENTO COM O INIBIDOR DA RHO-QUINASE

Foi utilizado no estudo o inibidor da Rho-quinase altamente seletivo, o (+)-*(R)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)* dihidrocloridrato de ciclohexano monohidrato de carboxamida, (Y-27632). Baseado no protocolo de Henry et al. (2005), nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo experimental os camundongos receberam Y-27632 (10 mg/kg) administrado por via intranasal 1 hora antes de cada desafio com ovoalbumina.

3.2.2. TRATAMENTO COM O CORTICOSTEROIDE

A partir do 22º dia do protocolo experimental iniciou-se o tratamento diário com dexametasona nos grupos de camundongos que receberam o tratamento com corticosteroides até o dia 29 do protocolo experimental. Baseado no protocolo de Thomas et al. (2012) em camundongos BALB/c, a dexametasona foi administrada por via i.p., na dose de 1 mg/kg. Nos dias de inalação com ovoalbumina, a dexametasona foi aplicada uma hora antes da exposição ao antígeno.

3.2.3. TRATAMENTO COM O INIBIDOR DO NFκB

Foi utilizado no estudo um inibidor específico do NFκB, o éster fenil do ácido cafeico (CAPE). Os camundongos receberam injeção i.p. com 10 mg/kg/dia em 200µl de CAPE (Sigma, St. Louis, MO) nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo experimental (Arantes Costa et al., 2008) pelo menos 1 hora antes da inalação com OVA. Este protocolo foi baseado em estudos prévios que demonstraram que a dosagem ótima de CAPE com efeitos não tóxicos e terapêuticos era de 10 mg/kg/dia (Jung et al., 2008; Park et al., 2008)

FIGURA 8. Esquema de inalações e tratamentos

3.3. AVALIAÇÃO DA HIPERRESPONSIVIDADE À METACOLINA

Após 24 horas do término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com Tiopental (250 mg/kg ip.), traqueostomizados e ventilados mecanicamente a uma frequência de 120 respirações /minuto e corrente de 8 ml kg utilizando um ventilador Harvard 683 (*Harvard Aparelho, South Natick, Mass., EUA*). Para abolir seu esforço ventilatório, os animais receberam pancurônio (0,2 mg/kg i.p.). Os sinais de pressão traqueal e o volume foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão (*Honeywell 163PC01D36, Freepot, IL*) e convertidos por placa analógica digital (*DT01EZ, Data Translation, Malboro, MA*). Os valores de resistência e elastância do sistema respiratório foram calculados através da equação do movimento do sistema respiratório, descrita a seguir:

$$- \text{Ptr}(t) = \text{Rrs} \cdot V'(t) + \text{Ers} \cdot V(t)$$

onde: t é tempo, Ptr é pressão traqueal, Rrs é resistência do sistema respiratório, Ers é elastância do sistema respiratório V' é fluxo aéreo e V é o volume pulmonar. Foram calculados os valores de Rrs e Ers basais e máximos

após a administração de aerossol de metacolina (3, 30 e 300mg/ml, por 1 minuto).

Ao final da avaliação, os camundongos foram eutanasiados através da injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50mg/Kg i.p) e heparinizados (1000 IU) por via intravenosa imediatamente antes da secção da aorta abdominal e veia cava. A parede torácica anterior foi aberta e os pulmões foram removidos em bloco com o coração para os estudos morfométricos e análises histológicas.

Figura 9. Esquema demonstrando realização da mecânica pulmonar respiratória: Os animais foram colocados em um pletismógrafo de acrílico e conectados a um ventilador mecânico (120 ciclos por minuto, 10 mL/Kg), um sistema de inalação conectado ao ventilador liberava doses de metacolina (3, 30, 300mg/mL, por 1 minuto cada). Os sinais de pressão traqueal e o volume pulmonar foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão, convertidos por placa analógica digital. Através da esqueção do movimento onde: Fr – frequência respiratória, VC – volume corrente, (t) – tempo, Ptr – pressão traqueal, Rrs – resistência do sistema respiratório, Ers – elastância do sistema respiratório, V' – fluxo de ar e V – volume do pulmão, foram obtidos os valores de Ers e Rrs.

3.4. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO EXALADO

Antes da realização da avaliação de hiperresponsividade à metacolina, o NO foi coletado na porção expiratória do ventilador através de um balão impermeável ao NO (*Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, USA*) durante 10 minutos. Após o término do período de coleta, os balões foram selados para posterior análise.

O óxido nítrico foi mensurado por quimioluminescência através de um analisador de resposta rápida (280 NOA – *Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA*). A concentração média de NO foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice da concentração de NO no ar exalado.

3.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

Após a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 µm de espessura e as lâminas foram coradas conforme a descrição a seguir. Para a coloração de Picro-Sírius (fibras colágenas), os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram coradas por 1 hora no Picro-Sírius à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos.

Foi utilizada a técnica de coloração LUNA para a avaliação da densidade de eosinófilos. O tecido foi desparafinado e hidratado com água destilada, as lâminas foram coradas na solução Hematoxilina-Escarlate por 5 minutos e lavadas em água corrente com uma passagem em água destilada. Foi diferenciado o núcleo em solução álcool-ácido a 1% até a tonalidade nuclear desejada. As lâminas foram lavadas novamente em água corrente e reveladas em solução de carbonato de lítio, até que os eosinófilos da seção ficassem vermelhos (15 segundos aproximadamente). Ao final todo o processo, o tecido foi desidratado em álcool 95%, 100% e xilol com duas mudanças cada solução.

As lâminas com cortes histológicos pulmonares foram previamente preparadas com 3-aminopropil-trietoxissilano Silano (*Sigma*). Inicialmente as lâminas foram submetidas à desparafinização (Xilol 60°C por 5 minutos) e hidratação (Xilol; Etanol 95% e Etanol 70%). Posteriormente foram lavadas com água corrente, água deionizada e PBS, sendo então submetidas aos seguintes procedimentos:

- Recuperação antigênica: para detecção da expressão das colorações supracitadas, as lâminas foram imersas em solução de Citrato com pH 6,00 (Target Retrieval Solution, DAKO, California, EUA) e expostas ao vapor em panela de pressão (*Dako Cytomation, California, Inc.*) por 1 minuto à 125°C.
- Bloqueio de Peroxidase Endógena e Ligações Inespecíficas: O bloqueio de peroxidase endógena foi realizado com metanol e água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (10 minutos), seguido de lavagem com água corrente e água

deionizada (3 minutos em ambas). Posteriormente as lâminas foram lavadas em solução de PBS (3 minutos).

- Incubação com Anticorpo Primário: Os anticorpos primários foram diluídos em solução de BSA (*Bovine serum albumin*) e aplicados sobre cada lâmina. A Tabela 1 mostra os anticorpos utilizados e suas respectivas diluições. Em seguida, as lâminas foram incubadas *overnight* em uma câmara úmida em geladeira à 4°C.

- Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS (3 vezes de 3 minutos) e incubadas com anticorpo secundário *ABCkit Vectastain* (Vector Elite) - por 30 minutos em estufa à 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas novamente em PBS (3 vezes de 3 minutos) e incubadas com o Complexo conjugado com peroxidase *ABCkit Vectastain* (Vector Elite) por 30 minutos em estufa a 37°C.

- Revelação: Após lavagem das lâminas com PBS (3 vezes de 3 minutos), foi realizada a revelação pelo cromógeno diaminobenzidina (DAB) (*DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca*). Após, as lâminas foram lavadas com água corrente e água destilada (10 e 2 minutos, respectivamente).

- Contracoloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) durante 10 segundos e lavadas com água corrente (5 minutos). Após a limpeza, foram desidratadas (Etanol absoluto, 95% e 70%), diafanizadas (Xilol por 15 minutos) e montadas com as lamínulas para posterior microscopia.

COLORAÇÃO	TITULAÇÃO
Actina	1:600 (MOUSE)
CD4+	1:600 (RAT)
CD8+	1:600 (MOUSE)
Células Dendríticas	1:300 (RABBIT)
IL2	1:250 (GOAT)
IL4	1:150 (GOAT)
IL5	1:600 (RABBIT)
IL13	1:500 (GOAT)
IL17	1:800 (RABBIT)
INF γ	1:800 (GOAT)
iNOS	1:800 (MOUSE)
Isoprostano (8-iso-PGF-2 α)	1:1500 (GOAT)
MMP9	1:500 (RABBIT)
NF κ b	1:800 (GOAT)
ROCK2	1:50 (GOAT)
TGF β	1:600 (MOUSE)
TIMP1	1:100 (RABBIT)

Tabela 1: Descrição dos anticorpos utilizados na técnica de imunohistoquímica assim como as titulações utilizadas.

3.6. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a contagem de células de células positivas para iNOS, NF κ B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, CD4+, CD8+, ROCK-2, IFN- γ , TGF- β , MMP9, TIMP-1, células dendríticas e eosinófilos foi utilizada a técnica de contagem de pontos (Weibel, 2010) com o auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio e sobreposto ao tecido (10⁴ μ m² de área total)

O retículo foi posicionado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio (*Figura 10*). Foram quantificadas as células positivas que infiltravam a parede da via aérea, entre o epitélio brônquico e a adventícia, contadas em aumento de 1.000x. Foi obtida a relação entre o número de pontos que incidiam nas células positivas dentro do campo do retículo, dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido presente nesse mesmo campo do retículo. O número de células expresso por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$). (Tibério et al., 1997, Leick-Maldonado et al., 2004).

Para a avaliação do infiltrado celular nos septos alveolares foi utilizado um retículo de 100 pontos acoplado à ocular do microscópio, foi quantificado o número de pontos que incidiam no tecido alveolar em cada campo e nas células positivas presentes nos septos alveolares. A densidade de células foi determinada pelo número de células positivas de cada campo dividido pela área de tecido. As medidas foram expressas por células/ $10^4\mu\text{m}^2$. A contagem foi feita em 10 campos de fragmento de tecido pulmonar periférico em cada animal em um aumento de 1000x.

Figura 10. Fotomicrografia exemplificando o posicionamento do retículo na via aérea, para realização da técnica de contagem de pontos.

3.7. ANALISADOR DE IMAGENS

As fracções de volume de fibras colágenas, PGF2 alfa e actina foram analisadas por meio do analisador de imagem (*ImageProPlus*) e a medida de densidade óptica foi o método empregado para a análise. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio *Leica DM4000B* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) e uma câmera digital *Leica DFC420* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) conectados a um computador através do software *Leica Qwin* (*Leica Microsystems, Cambridge, Inglaterra*), que adquiriu as imagens. Foram fotografados dez campos por lâmina dos septos alveolares e quatro vias aéreas em cada animal com ampliação de 400x.

A análise de imagens foi realizada através do "software" *ImageProPlus* (*Media Cybernetics, Bethesda, MD*). Este "software" permite que lhe seja informado um "*threshold*" dos tons de cores que representam as áreas positivas e assim quantifica-las na área determinada previamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva (fração de volume).

3.8. DOSAGEM DE IgG1, IgG2A E IgE POR ELISA

A dosagem de anticorpos foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Para determinação de IgE, IgG1 e IgG2a a microplaca foi recoberta com antígeno OVA, após incubação e lavagem, os plasmas foram adicionados em uma diluição previamente determinada. Para revelar a reação foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados específicos para IgE, IgG1 ou IgG2a, seguido de incubação e lavagem, a solução reveladora contendo conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase, substrato e cromógeno foi adicionada. A reação de cor foi lida em espectrofotômetro a 490 nm e foi proporcional a quantidade dos isotipos na amostra. Os resultados foram expressos como a média das absorbâncias $\pm$ erro-padrão das diluições seriadas das amostras de cada grupo.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando o programa *SigmaStat* (*Jandel Scientific, San Rafael, CA*). Para os resultados que tiveram distribuição

paramétrica, foi utilizado nas comparações múltiplas o teste de *Holm-Sidak*, sendo estes resultados expressos na forma de média e erro padrão e o gráfico na forma de barras. Utilizamos análise de variância para fator ONE-WAY. Foi considerado significativo um $p < 0,05$ para todas as análises.

4.RESULTADOS

4.1. Sensibilização: Elisa para IgE, IgG1 e IgG2A

IgE

A Figura 11 mostra a densidade óptica para IgE. Houve aumento de IgE nos animais sensibilizados com OVA em relação ao controle SAL ($p < 0,05$). Foi observada aumento de IgE nos animais sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B em relação ao grupo SAL ($p < 0,05$).

Figura 11: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a densidade óptica de IgE dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

IgG1

Não houve diferença entre os grupos Ova, OVA-RHo, OVA-COrt e OVA-CAPE

IgG2A

A Figura 12 mostra a densidade óptica para IgG2A. Houve aumento de IgG2A nos animais sensibilizados com OVA em relação ao controle SAL ($p<0,05$). Foi observada aumento na densidade óptica nos animais sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB em relação ao grupo SAL ($p<0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA, OVA-RHO, OVA-CORT e OVA-CAPE.

Figura 12: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a densidade óptica de IgG2A dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p<0,05$ comparado ao grupo SAL.

Células dendríticas

Figura 13 mostra o número células positivas para células dendríticas nas vias aéreas. Houve aumento de células dendríticas no grupo OVA ($14,58 \pm 1,48$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $3,37 \pm 0,7$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células dendríticas nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $5,87 \pm 0,92$, OVA-CORT: $9,20 \pm 0,71$, OVA-CAPE: $4,12 \pm 0,68$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Os grupos OVA-RHO e OVA-CAPE apresentaram uma maior redução de células dendríticas comparativamente ao grupo OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 13: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para células dendríticas nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CORT.

A Figura 14 mostra o número células positivas para células dendríticas nos septos alveolares. Houve aumento de células dendríticas no grupo OVA ($20,24 \pm 2,31$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,78 \pm 0,31$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células dendríticas nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $3,68 \pm 0,56$, OVA-CORT: $2,78 \pm 0,43$, OVA-CAPE: $3,73 \pm 0,6$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 14: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para células dendríticas nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

4.2. Hiperresponsividade

Resistência do sistema respiratório

A resposta máxima de resistência do sistema respiratório (Rrs máxima) após o desafio com metacolina está descrito na figura 15. Houve um aumento na Rrs máxima nos animais sensibilizados a OVA (OVA: $1.07 \pm 0.056 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$) comparado ao controle (SAL: $0.75 \pm 0.16 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$, $p < 0.05$). Houve uma redução na Rrs no grupo OVA-CAPE (OVA-Cape: $0.77 \pm 0.01 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$) comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre OVA-Rho (OVA-Rho: $0.98 \pm 0.14 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$) e o grupo OVA-CORT (OVA Cort: $0.92 \pm 0.07 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$) quando comparados ao grupo OVA.

Figura 15: Resposta máxima de resistência do sistema respiratório (Rrs máxima) após o desafio com metacolina * $p < 0.05$ comparado ao grupo SAL. ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

Elastância do sistema respiratório

A resposta máxima de elastância do sistema respiratório (Ers máxima) após o desafio com metacolina está descrito na figura 16. Houve um aumento na Ers máxima no grupo OVA (OVA: $89.21 \pm 10.09 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1}$) comparado ao controle (SAL: $42.22 \pm 1.67 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1}$, $p < 0,05$). Houve um aumento na Ers nos animais sensibilizados e tratados com os inibidores ou corticosteroide (OVA-CAPE: $53.39 \pm 2.47 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1}$, OVA-RHO: $58.66 \pm 3.67 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1}$, OVA-CORT: $53.09 \pm 3.85 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1}$) quando comparados ao grupo OVA ($p < 0.05$).

Figura 16: Resposta máxima de elastância do sistema respiratório (Ers máxima) após o desafio com metacolina. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

ROCK-2

A Figura 17 mostra o número células positivas para ROCK-2 nas vias aéreas. Houve aumento de ROCK-2 no grupo OVA ($9,4 \pm 0,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $2,72 \pm 0,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para ROCK-2 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $4,59 \pm 0,23$, OVA-CORT: $6,04 \pm 0,37$, OVA-CAPE: $4,45 \pm 0,24$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Os grupos OVA-RHO e OVA-CAPE apresentaram uma maior redução de células positivas para ROCK-2 comparativamente ao grupo OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 17: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para ROCK-2 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CORT.

A Figura 18 mostra o número células positivas para ROCK-2 nos septos alveolares. Houve aumento de ROCK-2 no grupo OVA ($9,65 \pm 0,51$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $2,93 \pm 0,25$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para ROCK-2 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $4,81 \pm 0,22$, OVA-CORT: $5,33 \pm 0,35$, OVA-CAPE: $6,38 \pm 0,41$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-RHO apresentou uma maior redução de células positivas para ROCK-2 comparativamente ao grupo OVA-CAPE ($p < 0,05$).

Figura 18: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para ROCK-2 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE.

Actina

A Figura 19 mostra a fração de volume para actina nas vias aéreas. Houve aumento de actina no grupo OVA ($10,13 \pm 0,76$ %) em relação ao controle (SAL: $2,80 \pm 0,32$ %, $p < 0,05$). Foi observado redução da fração de volume de actina no grupo sensibilizado e tratado com o inibidor da Rho-quinase (OVA-RHO: $8,06 \pm 0,39$ %) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos tratados com corticoide ou inibidor do NF κ B (OVA-CORT: $11,37 \pm 0,23$, OVA-CAPE: $10,78 \pm 0,36$ %) em relação ao grupo OVA.

Figura 19: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a fração de volume de actina nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A Figura 20 mostra a fração de volume para actina nos septos alveolares. Houve aumento de actina no grupo OVA ($9,63 \pm 0,47$ %) em relação ao controle (SAL: $3,46 \pm 0,21$ %, $p < 0,05$). Foi observado redução da fração de volume de actina nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $5,68 \pm 0,24$, OVA-CORT: $6,28 \pm 0,22$, OVA-CAPE: $5,38 \pm 0,21$ %) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 20: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a fração de volume de actina nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

4.3. Inflamação

Eosinófilos

A Figura 21 mostra o número de eosinófilos nas vias aéreas. Houve aumento de eosinófilos no grupo OVA ($28,45 \pm 3,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $5,47 \pm 0,82$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de eosinófilos nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $12,55 \pm 1,17$, OVA-CORT: $10,32 \pm 2,24$, OVA-CAPE: $10,37 \pm 1,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA-RHO, OVA-CORT e OVA-CAPE.

Figura 21: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de eosinófilos nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado a OVA, ** $p < 0,05$ comparado a SAL.

A Figura 22 mostra o número de eosinófilos nos septos alveolares. Houve aumento de eosinófilos no grupo OVA ($2,2 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,03 \pm 0,01$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Não foi observado diferença entre os grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $2,1 \pm 1,0$ OVA-CORT: $2,53 \pm 0,42$, OVA-CAPE: $1,53 \pm 0,26$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$).

Figura 22: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de eosinófilos nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, * $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA

Células positivas para CD4+ e CD8+

CD4+

A Figura 23 mostra o número células positivas para CD4+ nas vias aéreas. Houve aumento de CD4+ no grupo OVA ($5,99 \pm 0,91$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,08 \pm 0,09$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para CD4+ nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,72 \pm 0,46$, OVA-CAPE: $3,31 \pm 0,57$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos OVA e OVA-CORT (OVA-CORT: $6,28 \pm 0,92$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$). O grupo OVA-RHO apresentou uma maior redução de células positivas para CD4+ comparativamente aos grupos OVA-CAPE e OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 23: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD4+ nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA-CORT e OVA-CAPE.

A Figura 24 mostra o número células positivas para CD4+ nos septos alveolares. Houve aumento de CD4+ no grupo OVA ($9,71 \pm 0,94$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,72 \pm 0,21$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para CD4+ nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $2,97 \pm 0,49$, OVA-CORT: $4,64 \pm 0,53$, OVA-CAPE: $1,88 \pm 0,4$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CAPE apresentou uma maior redução de células positivas para CD4+ comparativamente aos grupos OVA-CORT e OVA-RHO ($p < 0,05$).

Figura 24: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD4+ nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA-RHO e OVA-CORT.

CD8+

A Figura 25 mostra o número células positivas para CD8+ nas vias aéreas. Houve aumento de CD8+ no grupo OVA ($1,62 \pm 0,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,06 \pm 0,29$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para CD8+ nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $0,79 \pm 0,14$, OVA-CAPE: $0,86 \pm 0,14$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos OVA e OVA-CORT (OVA-CORT $1,35 \pm 0,31$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$).

Figura 25: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD8+ nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A Figura 26 mostra o número células positivas para CD8+ nos septos alveolares. Houve aumento de CD8+ no grupo OVA ($3,56 \pm 0,33$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,71 \pm 0,20$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observada redução do número de células positivas para CD8+ nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $0,88 \pm 0,12$, OVA-CORT: $1,48 \pm 0,15$, OVA-CAPE: $1,14 \pm 0,12$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 26: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para CD8+ nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

Células positivas para citocinas

IL-2

A Figura 27 mostra o número células positivas para IL-2 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-2 no grupo OVA ($5,06 \pm 0,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,55 \pm 0,1$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-2 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,33 \pm 0,17$, OVA-CORT: $2,17 \pm 0,23$, OVA-CAPE: $0,90 \pm 0,11$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CAPE apresentou uma maior redução de células positivas para IL-2 comparativamente ao grupo OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 27: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO e OVA-CORT.

A Figura 28 mostra o número células positivas para IL-2 nos septos alveolares. Houve aumento de IL-2 no grupo OVA ($4,08 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,36 \pm 0,11$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-2 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,05 \pm 0,09$, OVA-CORT: $1,61 \pm 0,17$, OVA-CAPE: $0,59 \pm 0,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CAPE apresentou uma maior redução de células positivas para IL-2 comparativamente ao grupo OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 28: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-2 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO e OVA-CAPE.

IL-4

A Figura 29 mostra o número células positivas para IL-4 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-4 no grupo OVA ($5,18 \pm 0,43$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,54 \pm 0,14$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-4 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,69 \pm 0,25$, OVA-CORT: $0,68 \pm 0,14$, OVA-CAPE: $1,34 \pm 0,22$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA. O grupo OVA-CORT apresentou uma maior redução de células positivas para IL-4 comparativamente ao grupo OVA-RHO ($p < 0,05$).

Figura 29: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE e OVA-RHO.

A Figura 30 mostra o número células positivas para IL-4 nos septos alveolares. Houve aumento de IL-4 no grupo OVA ($4,99 \pm 0,36$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,19 \pm 0,05$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-4 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $0,85 \pm 0,14$, OVA-CORT: $0,54 \pm 0,12$, OVA-CAPE: $0,88 \pm 0,13$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 30: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-4 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

IL-5

A Figura 31 mostra o número células positivas para IL-5 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-5 no grupo OVA ($5,18 \pm 0,43$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,54 \pm 0,14$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-5 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,46 \pm 0,23$, OVA-CORT: $0,81 \pm 0,14$, OVA-CAPE: $1,99 \pm 0,25$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CORT apresentou uma maior redução de células positivas para IL-5 comparativamente ao grupo OVA-CAPE ($p < 0,05$).

Figura 31: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE.

A Figura 32 mostra o número células positivas para IL-5 nos septos alveolares. Houve aumento de IL-5 no grupo OVA ($6,42 \pm 0,56$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,24 \pm 0,58$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para de IL-5 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $1,37 \pm 0,2$, OVA-CORT: $0,82 \pm 0,1$, OVA-CAPE: $1,59 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 32: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-5 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

IL-13

A Figura 33 mostra o número células positivas para IL-13 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-13 no grupo OVA ($6,29 \pm 0,55$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $1,45 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-13 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $0,42 \pm 0,11$, OVA-CORT: $2,25 \pm 0,32$, OVA-CAPE: $3,18 \pm 0,39$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CAPE apresentou uma maior redução de células positivas para IL-13 comparativamente aos grupos OVA-CORT e OVA-RHO ($p < 0,05$).

Figura 33: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO e OVA-CORT.

A Figura 34 mostra o número células positivas para IL-13 nos septos alveolares. Houve aumento de IL-13 no grupo OVA ($9,57 \pm 0,43$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $3,46 \pm 0,21$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-13 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $6,17 \pm 0,53$, OVA-CORT: $6,0 \pm 0,36$, OVA-CAPE: $4,79 \pm 0,37$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CAPE apresentou uma maior redução de células positivas para IL-13 comparativamente ao grupo OVA-RHO ($p < 0,05$).

Figura 34: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-13 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO.

IL-17

A Figura 35 mostra o número células positivas para IL-17 nas vias aéreas. Houve aumento de IL-17 no grupo OVA ($8,18 \pm 0,46$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $2,57 \pm 0,21$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado a redução do número de células positivas para IL-17 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $2,80 \pm 0,20$, OVA-CORT: $4,75 \pm 0,29$, OVA-CAPE: $4,89 \pm 0,45$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SAL, OVA-RHO e OVA-CAPE, OVA-CORT. O grupo OVA-RHO apresentou uma maior redução de células positivas para IL-17 comparativamente aos grupos OVA-CORT e OVA-CAPE ($p < 0,05$).

Figura 35: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CORT e OVA-CAPE.

A Figura 36 mostra o número células positivas para IL-17 nos septos alveolares. Houve aumento de IL-17 no grupo OVA ($9,74 \pm 0,4$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $2,7 \pm 0,21$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IL-17 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $3,45 \pm 0,33$, OVA-CORT: $5,18 \pm 0,33$, OVA-CAPE: $4,33 \pm 0,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA. O grupo OVA-RHO apresentou uma maior redução de células positivas para IL-17 comparativamente aos grupos OVA-CORT e OVA-CAPE ($p < 0,05$).

Figura 36: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado aos grupos OVA-CORT e OVA-CAPE.

IFN- γ

A Figura 37 mostra o número células positivas para IFN- γ nas vias aéreas. Houve aumento de IFN- γ no grupo OVA ($4,78 \pm 0,59$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,56 \pm 0,15$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para IFN- γ nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $1,25 \pm 0,19$, OVA-CORT: $0,99 \pm 0,14$, OVA-CAPE: $1,11 \pm 0,18$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 37: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IFN- γ nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A Figura 38 mostra o número células positivas para IFN- γ nos septos alveolares. Houve aumento de IFN- γ no grupo OVA ($4,69 \pm 0,34$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,36 \pm 0,08$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observada redução do número de células positivas para IFN- γ nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $0,79 \pm 0,11$, OVA-CORT: $1,09 \pm 0,31$, OVA-CAPE: $0,87 \pm 0,09$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 38: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para IFN- γ nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

4.4. Resposta de remodelamento

Fibras colágenas

A Figura 39 mostra a fração de volume para fibras colágenas nas vias aéreas. Houve aumento de fibras colágenas no grupo OVA ($40,72 \pm 4,17$ %) em relação ao controle (SAL: $25,33 \pm 2,56$ %, $p < 0,05$). Foi observado redução da fração de volume de fibras colágenas nos grupos sensibilizados e tratados com os inibidores de NFkB, Rho-quinase e corticoide (OVA-CAPE: $30,99 \pm 2,3$ %, OVA-RHO: $25,92 \pm 2,2$, OVA-CORT: $28,96 \pm 2,29$ %) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 39: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a fração de volume de fibras colágenas nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A Figura 40 mostra a fração de volume para fibras colágenas nos septos alveolares. Houve aumento de fibras colágenas no grupo OVA ($22,69 \pm 1,74 \%$) em relação ao controle (SAL: $12,47 \pm 1,76 \%$, $p < 0,05$). Foi observado redução da fração de volume de fibras colágenas nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $10,66 \pm 2,41$, OVA-CORT: $12,61 \pm 1,67$, OVA-CAPE: $10,23 \pm 1,98 \%$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 40: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para a fração de volume de fibras colágenas nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

TIMP-1

A Figura 41 mostra o número células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas. Houve aumento de TIMP-1 no grupo OVA ($7,49 \pm 1,53$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,81 \pm 0,39$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para TIMP-1 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $0,4 \pm 1,78$, OVA-CORT: $1,87 \pm 0,52$, OVA-CAPE: $3,77 \pm 0,89$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Houve uma redução no grupo OVA-RHO comparativamente aos grupos OVA-CAPE e OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 41: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TIMP-1 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CORT e OVA-CORT.

A Figura 42 mostra o número células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares. Houve aumento de TIMP-1 no grupo OVA ($4,29 \pm 0,33$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,31 \pm 0,17$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para TIMP-1 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,4 \pm 0,34$, OVA-CORT: $0,55 \pm 0,17$, OVA-CAPE: $0,42 \pm 0,06$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 42: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TIMP-1 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE.

MMP-9

A Figura 43 mostra o número células positivas para MMP-9 nas vias aéreas. Houve aumento de MMP-9 no grupo OVA ($5,62 \pm 0,46$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $2,04 \pm 0,28$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para MMP-9 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $1,67 \pm 0,21$, OVA-CORT: $2,83 \pm 0,24$, OVA-CAPE: $2,32 \pm 0,24$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 43: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO.

A Figura 44 mostra o número células positivas para MMP-9 nos septos alveolares. Houve aumento de MMP-9 no grupo OVA ($3,66 \pm 0,19$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,82 \pm 0,15$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p<0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para MMP-9 nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $1,11 \pm 0,11$, OVA-CORT: $1,9 \pm 0,08$, OVA-CAPE: $1,01 \pm 0,09$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p<0,05$). Os grupos OVA-RHO e OVA-CAPE apresentaram uma maior redução de células positivas para MMP-9 comparativamente ao grupo OVA-CORT ($p<0,05$).

Figura 44: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p<0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p<0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p<0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE e OVA-RHO.

TGF- β

A Figura 45 mostra o número células positivas para TGF- β nas vias aéreas. Houve aumento de TGF- β no grupo OVA ($2,98 \pm 0,38$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,38 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para TGF- β nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $1,59 \pm 0,20$, OVA-CORT: $0,78 \pm 0,13$, OVA-CAPE: $1,28 \pm 0,20$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo. OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CORT apresentou uma maior redução de células positivas para TGF- β comparativamente ao grupo OVA-CAPE e OVA-RHO ($p < 0,05$).

Figura 45: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO e OVA-CAPE.

A Figura 46 mostra o número células positivas para TGF- β nos septos alveolares. Houve aumento de TGF- β no grupo OVA ($3,14 \pm 0,12$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,54 \pm 0,05$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p<0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para TGF- β nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $1,22 \pm 0,11$, OVA-CORT: $0,94 \pm 0,06$, OVA-CAPE: $1,66 \pm 0,07$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p<0,05$). O grupo OVA-CORT apresentou uma maior redução de células positivas para TGF- β comparativamente ao grupo OVA-CAPE e OVA-RHO ($p<0,05$).

Figura 46: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p<0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p<0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p<0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE.

4.5. Estresse oxidativo

NO exalado

A Figura 47 mostra o NO exalado pelo sistema respiratório. Houve um aumento no NO exalado no grupo OVA ($57,92 \pm 9,12$ ppb) em relação ao controle (SAL: $18,3 \pm 3,48$ ppb, $p < 0,05$). Foi observado redução de NO exalado nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $33,88 \pm 5,28$, OVA-CORT: $23,26 \pm 3,18$, OVA-CAPE: $16,55 \pm 2,54$ ppb) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos OVA-RHO, OVA-CORT e OVA-CAPE.

Figura 47: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o NO exalado dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

iNOS

A Figura 48 mostra o número células positivas para iNOS nas vias aéreas. Houve aumento de iNOS no grupo OVA ($4,39 \pm 0,29$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,32 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para iNOS nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $1,69 \pm 0,16$, OVA-CORT: $0,67 \pm 0,09$, OVA-CAPE: $1,01 \pm 0,15$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CORT apresentou uma maior redução de células positivas para iNOS comparativamente ao grupo OVA-CAPE e OVA-RHO ($p < 0,05$).

Figura 48: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para iNOS nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO e OVA-CAPE.

A Figura 49 mostra o número células positivas para iNOS nos septos alveolares. Houve aumento de iNOS no grupo OVA ($1,53 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,43 \pm 0,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para iNOS nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFkB (OVA-RHO: $0,79 \pm 0,04$, OVA-CORT: $0,71 \pm 0,06$, OVA-CAPE: $0,93 \pm 0,07$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CORT apresentou uma maior redução de células positivas para iNOS comparativamente ao grupo OVA-CAPE ($p < 0,05$).

Figura 49: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para iNOS nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-CAPE.

PGF-2 α

A Figura 50 mostra a fração de volume para isoprostano (PGF-2 α) nas vias aéreas. Houve aumento de PGF-2 α no grupo OVA ($17,96 \pm 4,08\%$) em relação ao controle (SAL: $4,84 \pm 0,4\%$, $p < 0,05$). Foi observado redução da fração de volume para PGF-2 α nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: $6,16 \pm 0,55$, OVA-CORT: $7,39 \pm 1,33$, OVA-CAPE: $6,14 \pm 0,64\%$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 50: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o conteúdo de isoprostano (8-iso-PGF-2 α) nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A Figura 51 mostra a fração de volume para isoprostano (PGF-2 α) nos septos alveolares. Houve aumento de PGF-2 α no grupo OVA (8,68 $\pm$ 0,81%) em relação ao controle (SAL: 2,16 $\pm$ 0,47%, $p < 0,05$). Foi observada redução da fração de volume para PGF-2 α nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NF κ B (OVA-RHO: 6,5 $\pm$ 0,33, OVA-CORT: 5,98 $\pm$ 0,42, OVA-CAPE: 3,77 $\pm$ 0,47%) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo OVA-CAPE apresentou uma maior redução na fração de volume de isoprostano comparativamente aos grupos OVA-RHO e OVA-CORT ($p < 0,05$).

Figura 51: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o conteúdo de isoprostano (8-iso-PGF-2 α) nos septos alveolares dos grupos estudados (n=6 para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA, *** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA-RHO e OVA-CORT.

4.6. Células positivas para NFκB

A Figura 52 mostra o número células positivas para NFκB nas vias aéreas. Houve aumento de NFκB no grupo OVA ($4,41 \pm 0,52$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,62 \pm 0,12$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observada redução do número de células positivas para NFκB nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFκB (OVA-RHO: $1,43 \pm 0,21$, OVA-CORT: $1,49 \pm 0,38$, OVA-CAPE: $1,36 \pm 1,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 52: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NFκB nas vias aéreas dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL, ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

A Figura 53 mostra o número células positivas para NFκ B nos septos alveolares. Houve aumento de NFκ B no grupo OVA ($3,45 \pm 0,37$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao controle (SAL: $0,39 \pm 0,11$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Foi observado redução do número de células positivas para NFκB nos grupos sensibilizados e tratados com o inibidor da Rho-quinase, corticoide e inibidor do NFκB (OVA-RHO: $1,04 \pm 0,15$, OVA-CORT: $0,77 \pm 0,19$, OVA-CAPE: $1,51 \pm 0,13$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,05$).

Figura 53: Gráfico de barras mostrando média $\pm$ erro padrão para o número de células positivas para NFκB nos septos alveolares dos grupos estudados ($n=6$ para cada grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos os efeitos do tratamento com inibidores de NF κ B (CAPE) ou Rho-quinase (Y-27632) em comparação com o tratamento com dexametasona em um modelo experimental de inflamação alérgica crônica em camundongos. Neste modelo, tanto em vias aéreas quanto em septos alveolares houve aumento de eosinófilos, da expressão de citocinas inflamatórias de perfil Th1/Th2/Th17, do remodelamento da matriz extracelular, avaliado pelo aumento do conteúdo de actina e fibras colágenas, bem como a avaliação da expressão celular de MMP-9, TIMP-1 e TGF- β . O NF κ B teve aumento na sua expressão celular. A hiperresponsividade à metacolina também foi observada.

Pudemos demonstrar que nas vias aéreas, o tratamento com o inibidor de Rho-quinase apresentou melhor resultado na redução das células positivas para IL-17, TIMP-1, MMP-9, ROCK-2, CD4+ e células dendríticas. O tratamento com corticosteroide, apresentou melhor resultado na redução das células positivas para IL-4, IL-5, TGF- β e iNOS. Já o tratamento com o inibidor de NF κ B, reduziu as células positivas para IL-2, IL-13, ROCK-2, células dendríticas e NO exalado. Nos septos alveolares, o inibidor de Rho-quinase apresentou melhor resultado na redução das células positivas para ROCK-2, TIMP-1, IL-17, MMP-9 e CD4+. O corticosteroide reduziu apenas as células positivas para TGF- β , TIMP-1 e conteúdo de iNOS. O tratamento com o inibidor de NF κ B reduziu as células positivas para IL-2, IL-13, MMP-9, TIMP-1 e o conteúdo de isoprostano PGF-2 α .

Passaremos a discutir então detalhadamente para cada aspecto funcional ou morfológico com foco na comparação entre cada uma das propostas terapêuticas utilizadas neste estudo.

Sensibilização

O modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos é um modelo amplamente utilizado para a avaliação de terapêuticas experimentais desta doença. Este é um modelo que utiliza repetidas injeções intraperitoneais e inalatórias com o antígeno ovoalbumina (Nials e Udín, 2008). Neste modelo está caracterizado que as alterações de inflamação e remodelamento pulmonar já ocorrem após as injeções intraperitoneais de ovoalbumina (Nials e Udín, 2008), portanto, como nosso estudo pretendeu avaliar o tratamento, iniciamos os tratamentos com o corticoide, CAPE ou Y-27632 após a segunda semana de exposição à ovoalbumina para evitar interferência na sensibilização dos animais e o tratamento pudesse gerar resultados. Os tratamentos foram realizados uma hora antes da inalação com ovoalbumina para que já exercessem um papel na resposta imediata do contato com o antígeno.

Observamos com a avaliação da IgE, IgG1 e IgG2A que nenhuma das intervenções farmacológicas interferiram nos títulos de anticorpos. Houve aumento de IgE e IgG2A em todos os animais, não havendo redução com os tratamentos. Entretanto, não observamos alteração nos valores de IgG1

Em relação ao número de células dendríticas, observamos uma efetividade de todos os tratamentos utilizados no presente trabalho, levando à redução do número destas células. Entretanto, pudemos observar uma maior redução do número de células dendríticas nas vias aéreas quando utilizamos os inibidores de Rho-quinase ou de NFκB.

As células dendríticas residem normalmente na mucosa das vias aéreas e no interstício (Lambrecht BN, van Rijt LS, 2006) e são especializadas na captura e processamento de antígenos para formar complexos de peptídeos do complexo de histocompatibilidade. Após o estímulo, as células dendríticas amadurecem e sofrem alterações na expressão de moléculas de adesão, de receptores e produção de citocinas, bem como alterações morfológicas. (Banchereau J e at., 2000; Schuurhuis DH et al., 2006). Ao mesmo tempo, as células dendríticas migram para os gânglios linfáticos e apresentam o antígeno para linfócitos T (Schuurhuis DH et al., 2006).

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

Khayyal et al. (2003) demonstraram o efeito benéfico do própolis em asmáticos e o mesmo efeito foi relatado em um modelo de asma experimental (Sy L et al., 2006).

No estudo de Li-Chieh Wang et al. (2009) foi investigado o efeito do CAPE sobre as funções das células dendríticas derivadas de monócitos humanos (MoDCs). Os autores investigaram se o CAPE tem efeito regulatório na produção de citocinas e quimiocinas e na capacidade de apresentação de antígenos em MoDCs estimulados por ácaros. O estudo mostrou que o CAPE inibiu a diferenciação dos monócitos para células dendríticas quando estimulado pelo LPS, dado que corrobora com o achado no presente estudo.

Quanto ao efeito do tratamento com Rho-quinase nas células dendríticas, não há estudos anteriores que evidenciassem esse efeito. Consideramos que esse efeito deva ser secundário ao efeito da modulação da Rho-quinase no controle da inflamação e na migração celular.

Há evidências de que a Rho-quinase ativada regula a contração de actina/miosina, independentemente do nível de cálcio livre (Nakashima et al, 2008). A actina faz parte do citoesqueleto das células endoteliais e a presença de agonistas inflamatórios aumenta os níveis de cálcio citossólico. O aumento dos níveis de cálcio diminui o AMPc e ativa o RhoA/Rho-quinase, causando a reorganização da actina cortical em fibras de estresse, que são feixes de actina/miosina necessárias para induzir contração celular (Pfeiffer et al, 2004). No parênquima distal, a actina é localizada nos elementos miocontráteis, como os miofibroblastos.

Hiperresponsividade

Para avaliação da hiperresponsividade à metacolina, utilizamos como parâmetro as respostas máximas tanto de elastância quanto de resistência do sistema respiratório. As respostas máximas de elastância do sistema respiratório após o desafio da metacolina foram diminuídas quando os animais sensibilizados foram tratados com Y-27632, CAPE ou corticosteroide comparados aos animais que receberam o veículo.

Em um estudo de inflamação alérgica crônica com cobaias, Righeti et al. (2014) mostraram que a inibição da Rho quinase pelo Y-27632 modulou a capacidade de resposta pulmonar distal, a inflamação, o remodelamento da matriz extracelular, assim como atenuou a elastância e resistência pulmonar distal. No presente estudo, as respostas máximas de resistência do sistema respiratório foram reduzidas apenas quando os animais sensibilizados foram tratados com o inibidor de NF κ B (CAPE) em comparação com os animais do grupo OVA não tratados. No trabalho citado, os animais foram tratados com o inibidor de Rho-quinase via inalatória, no presente estudo, utilizamos o inibidor de Rho-quinase via intranasal.

Xisto et al. (2005) verificaram aumento do conteúdo de actina na via aérea distal em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em ratos, alterações estas que apresentaram uma correlação positiva com o aumento da resistência e da elastância tecidual, evidenciando que a inflamação, as alterações mecânicas e o remodelamento não ocorrem apenas nas vias aéreas

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

Na mesma linha de pesquisa, Pigati et al. (2015) demonstraram que a inibição da Rho-quinase associado ou não ao tratamento com corticosteroides controlou a resposta de hiperresponsividade, o recrutamento de linfócitos e eosinófilos, as respostas Th1 e Th2, o remodelamento da matriz extracelular e resposta de estresse oxidativo nas vias aéreas e do parênquima distal neste modelo animal.

Possa et al., 2012 mostraram que o tratamento com Y-27632 foi efetivo na diminuição das respostas da mecânica do sistema respiratório após o desafio do antígeno. Entretanto, os autores anteriormente citados observaram redução tanto da elastância quanto da resistência do sistema respiratório e do tecido pulmonar distal. Essa diferença em relação à resposta da resistência observada no presente estudo pode ser devida a diferença nas doses e formas de administração das drogas, bem como do animal utilizado no modelo experimental. No presente estudo foram utilizados camundongos e nos estudos anteriormente relatados foram utilizadas cobaias. No entanto, não houve estudos prévios que avaliassem a comparação com inibição de NFκB com corticosteroides.

A resposta de hiperresponsividade pode ser modulada pela expressão de Rho-quinase-2. Em relação às células positivas para Rho-quinase-2, todos os tratamentos utilizados neste modelo experimental foram efetivos para reduzir a quantidade destas células. Todavia, quando comparamos os tratamentos

utilizados neste modelo, o tratamento com o inibidor de NF κ B apresentou maior efetividade nas vias aéreas para reduzir as células positivas para ROCK-2. Quando utilizamos o tratamento com o inibidor de Rho-quinase, pudemos observar que este respondeu melhor ao compararmos com o tratamento com corticosteroides tanto nas vias aéreas como nos septos alveolares. Cabe ressaltar que não existem estudos prévios avaliando o efeito do tratamento com CAPE na expressão de Rho-quinase-2.

Cabe ressaltar que o conteúdo de actina em vias aéreas e septos tem influência na resposta de hiperresponsividade. Nesse sentido, em relação ao conteúdo de actina, pudemos observar uma redução deste conteúdo neste modelo experimental determinado pelo efeito do tratamento com os inibidores de Rho-quinase, NF κ B ou corticosteroide. Há evidências de que a Rho-quinase ativada regula a contração de actina/miosina, independentemente do nível de cálcio livre (Nakashima et al, 2008). A actina faz parte do citoesqueleto das células endoteliais e a presença de agonistas inflamatórios aumenta os níveis de cálcio citossólico. O aumento dos níveis de cálcio diminui o AMPc e ativa o RhoA/Rho-quinase, causando a reorganização da actina cortical em fibras de estresse, que são feixes de actina/miosina necessárias para induzir contração celular (Pfeiffer et al, 2004). No parênquima distal, a actina é localizada nos elementos miocontráteis, como os miofibroblastos.

Os efeitos dos corticosteroides sobre a contração do músculo liso das vias aéreas podem estar relacionados à supressão das respostas agonistas induzidas pelo aumento do cálcio intracelular ou pela redução da regulação ligada aos receptores de desacoplamento (receptores muscarínicos M1 ou M3

histamínicos, H1). Sabe-se que os corticosteroides podem modular o relaxamento do músculo liso da via aérea ativando mecanismos dependentes de AMP cíclico. Os efeitos da dexametasona no músculo liso das vias aéreas humanas foram previamente estudados (Goldsmith et al., 2006) e os autores mostraram que nas células brônquicas humanas houve uma redução do nível de músculo liso. Esses efeitos foram mediados, pelo menos em parte, pela atenuação da transdução de mRNA e aumento da degradação proteica.

Em relação ao CAPE, um estudo investigou as vantagens de utilizar esta droga no tratamento da asma e demonstrou a função do CAPE na regulação da hiperresponsividade das vias aéreas. Nos camundongos sensibilizados com ovoalbumina e que foram tratados com o CAPE houve redução dessa resposta e também da expressão de alfa actina do músculo liso, de forma dependente da dose (Yuan Ma et al., 2016). Os dados acima expostos estão de acordo com os achados neste modelo de asma experimental utilizado no nosso trabalho. No entanto, os autores não compararam esses resultados ao observado com corticosteroides ou o inibidor de Rho-quinase.

Resposta inflamatória

Nosso estudo mostrou que todos os tratamentos foram eficazes em reduzir a resposta inflamatória (número de eosinófilos, células positivas para CD4+, CD8+, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 e IFN-gama) no modelo experimental utilizado. Mas cabe ressaltar que nas vias aéreas e septos alveolares, o tratamento com CAPE apresentou maior redução nas células positivas para IL-

2 e IL-13. O inibidor de Rho-quinase apresentou efeito tanto nas vias aéreas como no parênquima com maior redução nas células positivas para IL-17 e CD4+. O corticosteroide apresentou maior redução nas células positivas para IL-4 e IL-5 somente nas vias aéreas.

Vários estudos avaliaram a infiltração eosinofílica em modelos de asma experimental e mostraram que no parênquima pulmonar distal e nas vias aéreas de animais sensibilizados com ovoalbumina há um aumento no número destas células (Leick-Maldonado et al., 2004, Prado et al., 2006, Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009, Possa et al., 2012). Em um estudo relacionado, Souza et al., (2013) investigaram os efeitos dos tratamentos com montelucaste, corticosteróide e 1400W (um inibidor seletivo de iNOS) no tecido pulmonar periférico de cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica. Os resultados mostraram que o uso isolado de dexametasona foi capaz de reduzir o infiltrado eosinofílico e o número de células Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4 e IL-5). Assim, a combinação de um inibidor de iNOS e montelucaste causou uma redução máxima de IL-4, IL-5 e IFN- γ .

Nossos resultados relativos à modulação inflamatória corroboram dados da literatura que descrevem o efeito de um inibidor de NF κ B, Rho-quinase ou corticosteroide no recrutamento de eosinófilos. No entanto, é preciso ressaltar que os estudos que iremos citar avaliaram o efeito isolado de cada um desses tratamentos. El-hashim et al (2011) bloquearam as ações do NF κ B usando o inibidor da quinase ikB. O tratamento inibiu o aumento induzido por ovoalbumina no influxo de leucócitos das vias aéreas e diminuiu a porcentagem de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos nas vias aéreas. Taylan et al. (2016) investigaram o

efeito protetor do ácido cafeico fenetil ester (CAPE) sobre o dano pulmonar induzido pelo ácido acetilsalicílico em ratos. Os autores concluíram que o tratamento com CAPE melhorou a inflamação intersticial pulmonar e reduziu o número de eosinófilos

Lin et al., (2011) mostraram que o tratamento com CAPE em um modelo *in vitro* de fibroblastos pulmonares inibiu a produção de eotaxina neste modelo *in vitro* foi feito pré tratamento com CAPE e posterior estímulo de interleucina 4 (IL-4) e fator de necrose tumoral alfa. Os autores sugerem que o tratamento com CAPE pode ser um agente promissor no controle da secreção de eotaxina e, posteriormente, do influxo de eosinófilos.

Vários autores avaliaram a modulação do recrutamento eosinofílico pela via Rho/Rho-quinase (Adachi et al., 2001, Possa et al., 2012, Angeli et al., 2008, Righeti, et al., 2013). O estudo de Adachi et al. (2001), avaliaram eosinófilos em sangue periférico de humanos após a administração do inibidor da Rho-quinase (Y-27632). Os autores demonstraram que o uso deste inibidor reduz a eosinofilia em decorrência da diminuição da eotaxina, no entanto, o mecanismo de ação deste inibidor sobre a eotaxina não foi avaliada.

Taki et al. (2007) observaram que o inibidor de Rho-quinase Fasudil reduziu o número de eosinófilos após o desafio com alérgeno, embora não tenha afetado o recrutamento de outras células inflamatórias.

Schaller et al (2005) estudando o papel do inibidor das células CD8+ em camundongos sensibilizados demonstraram que houve diminuição significativa da hiperresponsividade e das citocinas IL-2, IL-5 e IL-13. Esses dados indicam

que as células CD8+ também desempenham um papel importante na exacerbação das respostas alérgicas através da produção das citocinas IL-4 e IL-13. Em outro estudo com modelo experimental de asma, Wang et al. (2011) demonstraram que as células CD4+/Th2 induziram a inflamação e, durante a fase crônica, a produção de IL17.

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

Boonpiyathad et al. (2013) estudando os níveis da IL-2 no condensado do ar exalado de vias aéreas de pacientes asmáticos e sua correlação com uma avaliação clínica da gravidade de asma, demonstraram que a IL-2 aumentou significativamente em indivíduos com asma grave, em comparação com os indivíduos saudáveis. Corroborando com essa teoria, Wang et al. (2015) demonstraram que os níveis elevados de IL-2 em crianças asmáticas com *Mycoplasma pneumoniae* estão associadas a gravidade da doença. Os autores acreditam que a IL-2 pode ser um importante biomarcador para estimar os riscos de exacerbações em crianças asmáticas infectadas com *Mycoplasma pneumoniae*.

Utilizando um modelo de inflamação alérgica, Choy et.al (2016) relataram o efeito de supressão da citocina Th2 na resposta Th17. Os autores relataram que a neutralização de IL-4 e/ou IL-13 resultou em aumento das células Th17 e inflamação neutrofílica no pulmão. No entanto, a neutralização da IL-13 e IL-17

protegeu os animais da eosinofilia, hiperplasia de muco e hiperreatividade das vias aéreas assim como a abolição da inflamação neutrofílica, sugerindo que terapias de combinação que controlem tanto respostas Th2 como Th17 podem maximizar a eficácia terapêutica em asmáticos. Da mesma forma, também em modelo experimental, a inibição da IL-13 e IL-17 atenuou a resposta eosinofílica (Hidefumi, Wakashin, 2008).

Já foi descrito que o aumento das células IL-17 pode estar correlacionado com o recrutamento eosinofílico e neutrofílico em modelo de asma (Choy et al. 2015). Trabalhos tem mostrado que as células de perfil Th17 são potentes indutores da resposta inflamatória tecidual, sendo um fator determinante da asma grave (Doe et al. 2010, Kudo, 2012; E. E. Way, 2013). Camundongos Balb/c expostos às partículas da exaustão do diesel (DEP) e extrato de ácaro de poeira domiciliar (HDM) apresentaram níveis elevados de IL-17A séricos. Outros autores também sugerem que a IL-17 também pode ser um importante marcador de gravidade da asma (Brandt et al. 2014).

Resposta de remodelamento

Quando avaliamos as alterações da matriz extracelular, em particular a fração de volume de fibras colágenas e o número de células positivas TIMP-1, MMP-9 e TGF-beta, observamos redução do conteúdo de fibras e do número de células positivas para esses marcadores nas vias aéreas e nos septos alveolares dos animais sensibilizados tratados com inibidores de NFκB e Rho-quinase ou com o corticosteroide. Mas cabe ressaltar que nos septos alveolares, o

tratamento com CAPE apresentou maior redução nas células positivas para TIMP-1 e MMP-9. O tratamento com inibidor de Rho-quinase apresentou tanto nas vias aéreas como nos septos alveolares uma maior redução nas células positivas para MMP-9 e nas vias aéreas apresentou uma redução mais efetiva das células positivas para TIMP-1. O tratamento com corticosteroide apresentou maior redução nas células positivas para TGF-beta tanto nos septos alveolares como nas vias aéreas e somente nos septos alveolares apresentou uma maior redução nas células positivas para TIMP-1.

Analisando os dados obtidos na literatura sabe-se que modelos experimentais de asma alérgica crônica em camundongos e cobaias mostram aumento da produção de colágeno, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa das vias aéreas e aumento da produção de muco (Prado et al. 2006; Angeli et al. 2008; Toledo et al., 2013, Righetti et al., 2014). O presente estudo corrobora os estudos anteriores que encontraram aumento da densidade de fibras colágenas nas vias aéreas de camundongos sensibilizados com ovoalbumina.

Tendo sua produção estimulada pela citocina TGF-beta, o colágeno é um marcador potencial de remodelamento asma (Burgess et al. 2016). Além disso, o remodelamento tecidual resulta de um processo de reparo em resposta a uma inflamação persistente, ativado por mediadores pró-inflamatórios, metaloproteinases, citocinas e fatores de crescimento (Vignola et al., 2003). Estudos sugerem que os corticosteróides inalados são incapazes de reduzir completamente as respostas de remodelamento pulmonar. Além disso, Goleva et al. (2007) mostraram que, em asmáticos resistentes ao tratamento com esteróides, houve um desequilíbrio MMP-9/TIMP-1 que promoveu a proteólise e

contribuiu para o remodelamento crônica das vias aéreas e a não reversibilidade da contração do músculo liso brônquico.

Chakir et al. (2003) estudaram biópsias brônquicas de pacientes com asma moderada e grave tratada com corticosteróides oral durante duas semanas. Os autores mostraram que este tratamento foi incapaz de reduzir o colágeno tipo I e II ou TGF-beta. Contrariamente, a administração de beclometasona em doses diárias de 800mcg diminuiu a deposição de colágeno em pacientes com asma. Miller et al. (2006) demonstraram que os corticosteróides inibem a expressão de TGF-beta1 em eosinófilos e macrófagos. McMillan et al. (2005) demonstraram em ratos cronicamente expostos à ovoalbumina que a budesonida conseguiu reduzir a deposição de colágeno e a produção de muco pela regulação da inflamação e da sinalização do TGF-beta1, em vez de diminuir a produção de proteína TGF-beta.

Zhou et al. (2009) mostraram que a ativação de Rho-quinase é crucial para a síntese de colágeno, o que pode estar relacionado a uma combinação de fatores, incluindo a inibição das vias de quinase N-terminal de C-Jun (JNK) e TGF-beta. Além disso, Kondrikov et al. (2011) concluíram que a toxicidade do oxigênio induz ROS a separar o inibidor de dissociação de nucleotídeos de guanina (GDI, um regulador da atividade Rho GTPase) da Rho-quinase, levando à ativação da via Rho-quinase e contribuindo para o aumento da síntese de colágeno tipo I.

Outros autores sugerem a importância da modulação NFκB no processo de remodelamento. A inibição perinatal do NFκB renal pode estar envolvida no

dano renal, particularmente na glomerulosclerose (Koeners et al, 2016). Sy et al (2011) mostraram que os efeitos do CAPE em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) de crianças asmáticas podem ser devidas a indução de células T reguladoras pela produção de fator de crescimento beta1 produzido de PBMCs.

É importante ressaltar que o inibidor específico da MMP-9, o TIMP-1, é reconhecido como portador de efeitos biológicos independentes das MMPs, tal como induzir apoptose celular (Kelly et al., 2000). Além disso, podemos especular que juntos estes resultados favorecem um processo de degradação/reparação nas fibras colágenas e elásticas da matriz extracelular.

TGF-beta é uma citocina conhecida por seu efeito anti-inflamatório. No entanto, na presença de IL-6, contribui para a formação da Th17 (Korn et al.2009). Isoladamente, TGF-beta promove a diferenciação em células T regulatória (Treg), que estão relacionadas com o processo de cicatrização e resolução da inflamação (Kimura et al. 2010). Em nosso estudo, após o tratamento com os inibidores de NFκB, Rho-quinase ou corticosteroides encontramos uma redução da expressão de TGF-beta.

Corroborando a importância do estudo do parênquima distal na sma com os dados deste estudo, além de intensa inflamação encontrada no parênquima pulmonar, Mauad et al. (2004) mostraram um aumento do conteúdo de fibras elásticas e um aumento na perda da estruturação das paredes alveolares em pequenas vias aéreas e no parênquima pulmonar de pacientes que morreram de asma fatal, mostrando a importância que as respostas do parênquima pulmonar

têm na patogênese de anormalidades funcionais observadas em pacientes com asma.

Estresse oxidativo

Nosso estudo mostrou que todos os tratamentos foram eficazes em reduzir a resposta de estresse oxidativo, sinalizado pela redução de NO exalado, de células positivas para iNOS, assim como do conteúdo de isoprostano no modelo experimental utilizado. Mas cabe ressaltar que no grupo que recebeu tratamento do CAPE houve maior redução no óxido nítrico exalado. Nos septos alveolares notamos maior redução de isoprostano PGF-2alfa. O tratamento com corticosteroide causou maior redução nas células positivas para iNOS tanto nas vias aéreas como nos septos alveolares.

Angeli et al. (2008) em um modelo experimental de inflamação pulmonar crônica utilizaram o L-NAME para inibir a óxido nítrico sintase (NOS). Os autores mostraram que o tratamento com L-NAME nos animais expostos à ovalbumina atenuou as células positivas para nNOS e iNOS, assim como isoprostano-8-PGF (2alfa) nos septos alveolares.

A inibição da iNOS reduz MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta na parede vascular brônquica de animais sensibilizados com ovoalbumina. Todos esses mediadores atuam na produção de colágeno e fibras elásticas, contribuindo para o remodelamento da matriz extracelular nas vias aéreas (Prado et al., 2006, Righeti et al., 2013, Aristoteles et al., 2014).

A redução nos níveis de células positivas para iNOS, MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta no presente estudo, assim como a diminuição do conteúdo de fibras colágenas nos grupos tratados são provavelmente devido à inibição da via da Rho-quinas. A redução do número de iNOS, MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta quando a Rho-quinase é inibida, está em concordância com os resultados de outros estudos (Righeti et al., 2013, Aristoteles et al., 2014).

Estudos anteriores mostraram que em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias, a inibição da iNOS atenuou a constrição das vias aéreas e do parênquima pulmonar distal, bem como da inflamação e modelamento, reduzindo tanto a deposição de colágeno quanto de fibras elásticas nas vias aéreas. Estes dados sugerem a contribuição do NO na fisiopatologia da asma (Prado et al. 2006, Starling et al. 2009). Outros autores demonstraram que houve uma diminuição significativa do isoprostano PGF2 alfa em animais expostos à ovoalbumina e tratados com 1400W, um inibidor específico de iNOS. (Starling et al. 2009, Souza et al., 2013)

Demonstrou-se claramente que a ativação do iNOS contribui para a promoção da produção de peroxinitrito, o que leva à peroxidação lipídica e a geração de isoprostano (8-iso-PGF2a). Os isoprostanos contribuem para a contração do músculo liso atuando através das tirosina quinases e Rho/Rho-quinase, levando à diminuição da atividade da fosfatase de cadeia leve da miosina e aumentando o nível de cadeia leve e contração da miosina fosforilada (Possa et al., 2012).

McGown et al. (2005) demonstraram que Fasudil reduziu a superregulação de iNOS induzida por LPS, reduzindo a inflamação microvascular. Jiang e George (2011) demonstraram que a inibição de Rho-quinase com Y-27632 inibe a expressão de iNOS através de uma via dependente de Rho-quinase em células epiteliais pulmonares.

Além disso, a redução da via do estresse oxidativo devido ao tratamento com os inibidores de NF κ B, da Rho-quinase ou corticosteroide pode também ter contribuído para a atenuação do remodelamento da matriz extracelular. A este respeito, Prado et al. (2006) mostraram que a inibição da iNOS reduz MMP-9, TIMP-1 e TGF-beta nas vias aéreas e nas paredes brônquicas. Estes mediadores atuam na produção de colágeno e fibras elásticas, contribuindo assim para o remodelamento da matriz extracelular.

O NO pode atuar também no aumento da resistência e elastância do sistema respiratório através da promoção de produção de peroxinitrito. Este agente é formado pela reação de síntese do NO e do superóxido, o que leva a peroxidação lipídica da membrana celular e consequente formação de isoprostano. O Isoprostano é um composto da prostaglandina derivados de peroxidação de radicais livres de ácidos graxos poliinsaturados nos tecidos (Prado et al., 2005).

Muitos estudos mostraram uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) na asma, rinite alérgica e dermatite atópica, que contribui, em parte, para a inflamação (Bowler e Crapo, 2002). Além disso, uma

quantidade elevada de eosinófilos ativados pela eotaxina pode levar à produção das ROS (Woerly et al., 2003; Elsner et al., 1998).

Won-Kyo J et al. (2008) examinaram o efeito do CAPE na geração de ROS, 72 horas após o último desafio com OVA. O nível de ROS no lavado broncoalveolar aumentou significativamente. Quando estes animais foram tratados com 10mg/Kg de CAPE, o nível de ROS foi cerca de 17% menor do que para níveis induzidos por OVA, que foi de (41,07%). Estes resultados sugerem que a administração do CAPE exerce um efeito inibitório na geração destas ROS. (Won-Kyo J et al., 2008)

6. NFκB

Nossa avaliação das células positivas para NFκB demonstrou uma atenuação do número destas células no modelo experimental após os tratamentos com inibidores de NFκB, Rho-quinase ou corticosteroides.

Estudos recentes têm indicado que o fator de transcrição NFκB é considerado um modulador crítico da inflamação tendo papel fundamental na patogênese das doenças pulmonares (Gosens et al., 2004). Muitos dos estímulos que aumentam a inflamação nas vias aéreas asmáticas resultam na ativação do NFκB. Estudos experimentais em animais tem demonstrado a presença do NFκB nos pulmões após exposição e desafio alérgico. (Ather et al. 2011; Aristóteles et al. 2013)

Observamos que a expressão celular de NF κ B foi reduzida nos animais tratados com o inibidor da Rho-quinase comparativamente ao notado em animais não tratados. Similarmente, Meyer-Schwezingen et al. (2009), quando avaliaram o papel da injúria inflamatória renal de camundongos tratados com o inibidor da Rho-quinase, obtiveram uma atenuação da sinalização de NF κ B, resultando na proteção contra a lesão. Estes dados sugerem que a sinalização do NF κ B é também presente na via da Rho-quinase.

A redução da transcrição induzida por NF κ B pode resultar em uma inibição da regulação positiva de RhoA induzida por IL-13 e TNF- α . Meyer-Schwesinger et al. (2009) observaram que a inibição de Rho-quinase atenuou a expressão de NF κ B, resultando em proteção contra lesões. Esses dados sugerem que a expressão de NF κ B também pode ser dependente de Rho-kinase.

Em modelos no modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica o tratamento com inibidor de INOS ou de Rho-quinase se associou a diminuição da resposta inflamatória, de mecânica pulmonar e de remodelamento, sendo que houve uma atenuação significativa da expressão de NF κ B (Starling et al. 2009; Possa et al., 2012, Righetti et al., 2013). Tiwari et al (2014) em um modelo de asma crônica usaram um extrato de *tinospora cordifolia*. Os resultados mostraram o nível de aumento de I κ B- α , que modulou a expressão de iNOS, ICAM-1 e COX-2.

Em outro estudo em humanos foram avaliados os efeitos do CAPE sobre as funções das células T CD4+ *in vitro*. O CAPE suprimiu a produção de IFN-

gama, IL-5 e a proliferação de células T CD4⁺ estimuladas por anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 tanto em indivíduos saudáveis como nos pacientes asmáticos. O CAPE inibiu a ativação do NFκB e a fosforilação da proteína quinase B (Akt), porém, não inibiu a fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK) nas células T. Esses resultados corroboram nossos achados, indicando que o CAPE inibe a produção de citocinas e a proliferação de células T, que podem estar relacionadas às vias de sinalização NFκB e Akt, e que as células T CD4⁺ CCR4⁺ são mais sensíveis à inibição CAPE. (Wang LC et al., 2010)

O presente estudo tem algumas limitações. Foram utilizados os inibidores de NFκB, da Rho-quinase e corticosteroide em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica, e devido a isto, não podemos extrapolar diretamente nossos achados aos esperados em seres humanos. Utilizamos vias de administração diferentes para fazer os tratamentos com inibidores de Rho-quinase, NFκB e corticosteroides. Outro fato a ser levado em consideração é que utilizamos apenas uma dose de cada um dos inibidores, assim como não fizemos testes com as associações destes. Vale ressaltar que o modelo de camundongos tem suas limitações conhecidas. No entanto, nossos resultados apoiam a importância das vias da Rho-quinase na e de NFκB na hiperresponsividade pulmonar, nas respostas inflamatórias, no remodelamento da matriz extracelular e na via do estresse oxidativo. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos exatos responsáveis por estas alterações.

6. CONCLUSÕES

Neste modelo de inflamação alérgica crônica pulmonar em camundongos tratados com corticosteroide (dexametasona), inibidor de Rho-quinase (Y-27632) ou inibidor do NF κ B (éster fenetil do ácido cafeico - CAPE) observamos que todos os tratamentos isoladamente foram efetivos em reduzir a hiperresponsividade, os marcadores inflamatórios, de remodelamento, de matriz extracelular e o stress oxidativo, assim como a expressão de NF κ B. Entretanto, cada um dos tratamentos mostrou-se mais eficaz em reduzir alguns dos parâmetros avaliados tanto nas vias aéreas como nos septos alveolares.

Nas vias aéreas:

1. A utilização de corticosteroide comparativamente ao tratamento com os inibidores específicos de Rho-quinase ou NF κ B foi mais efetivo no controle da expressão celular das citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-5), da expressão celular de iNOS e do número de células positivas para TGF- β .
2. O tratamento com o inibidor específico da Rho-quinase (Y-27632) comparativamente ao corticosteroide ou inibidor específico de NF κ B, foi mais efetivo em controlar a expressão celular de citocinas de perfil Th17 (IL-17), o remodelamento da matriz extracelular, reduzindo as células positivas para TIMP-1 e MMP-9, o número de células dendríticas e de células CD4 e ROCK-2 positivas.
3. O tratamento com o inibidor específico de NF κ B (CAPE) comparativamente ao uso do inibidor específico de Rho-quinase ou corticosteroide, foi mais efetivo em controlar a expressão celular de citocinas de

perfil Th2 (IL-2 e IL-13), reduzir o NO exalado e as células dendríticas e as células positivas para ROCK-2.

Nos septos alveolares:

4. O tratamento com corticosteroide, comparativamente ao uso de inibidores específicos de Rho-quinase ou NF κ B foi mais efetivo em reduzir as células positivas para TGF- β e TIMP-1, assim como a expressão de iNOS.
5. O tratamento com o inibidor específico da Rho-quinase (Y-27632), comparativamente ao uso de corticosteroide ou inibidor específico de NF κ B, foi mais efetivo em reduzir as células positivas para IL-17, MMP-9, células CD4 e ROCK-2 positivas.
6. O tratamento com o inibidor específico de NF κ B (CAPE) comparativamente ao uso do inibidor específico de Rho-quinase ou corticosteroide, foi mais efetivo em reduzir citocinas de perfil Th2 (IL-2 e IL-13), o isoprostano PGF-2 α e as células positivas para TIMP-1 e MMP-9.

Portanto, os inibidores de Rho-quinase e NF κ B mostraram-se efetivos no controle das alterações encontradas neste modelo experimental. Apesar de estudos mais aprofundados serem necessários, essas drogas podem representar potenciais alternativas para o tratamento da asma comparativamente ao uso dos corticoides.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Breitenlechner C, Gaßel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, Bossemeyer D. Protein Kinase A in Complex with Rho-Kinase Inhibitors Y-

27632, Fasudil, and H-1152P: *Structural Basis of Selectivity*. *Structure*, 2003; 11, 1595–1607.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response.

Immunol Today. 1992, 13(5):169-72.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF: Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005a, 289: L677–L683.

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

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

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

Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, Perini A, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério ID. Rho-Kinase Inhibition Attenuates Airway Responsiveness, Inflammation, Matrix Remodeling and Oxidative Stress Activation Induced by Chronic Inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;.[Epub ahead of print]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Shiraki A, Kume H, Makino Y, Ito S, Shimokata K, Honjo H et al. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF₂ α -induced contraction in airway smooth muscle. *Clinical and Experimental Allergy* 2008; 39:236-245.

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

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

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev* 2003, 83:1325-1358.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. *Chest* 2003;123(3 Suppl): 348S-55S.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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