NATHÁLIA BRANDÃO GOBBATO

**Estudo da ativação eosinofílica e de matriz extracelular de tecido pulmonar
periférico em cobaias com inflamação alérgica pulmonar: efeitos do
tratamento com dexametasona e antagonista do receptor do cisteinil-
leucotrieno D₄**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

Programa de Ciências Médicas

**Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos**

Orientadora: Dra. Edna Aparecida Leick Maldonado

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gobbato, Nathália Brandão

Estudo da ativação eosinofílica e de matriz extracelular de tecido pulmonar periférico em cobaias com inflamação alérgica pulmonar : efeitos do tratamento com dexametasona e antagonista do receptor do cisteinil-leucotrieno D₄ / Nathália Brandão Gobbato. -- São Paulo, 2012.

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

Orientadora: Edna Aparecida Leick Maldonado.

Descritores: 1.Asma 2.Cobaias 3.Dexametasona 4.Montelukaste

USP/FM/DBD-180/12

Dedico este trabalho,

Aos melhores pais do mundo, João Gobbato e Rosângela Gobbato, por sempre me ensinarem o valor dos estudos e por acreditarem no meu potencial

Aos meus queridos irmãos, João Humberto Gobbato Júnior e Beatriz Brandão Gobbato, pelo apoio constante em todos os momentos

Ao amor da minha vida, Vinicius Gimenes Rensi

Aos pacientes asmáticos, razão deste estudo...

AGRADECIMENTOS

Escrever os agradecimentos, talvez seja a tarefa mais difícil de todo este trabalho. Tentarei expressar com palavras, provavelmente singelas demais, toda a gratidão que sinto pelas pessoas que fazem parte da minha vida e mantiveram-se presentes durante a realização deste trabalho e deste sonho.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, Nossa Senhora da Medalha Milagrosa, Santo Expedito e Nossa Senhora Aparecida por estarem ao meu lado guiando meus passos hoje e sempre, protegendo-me de todo o mal, dando-me força para concretizar meus objetivos e determinação para vencer os desafios da vida. Sinto a forte presença de vocês em cada instante da minha vida, Obrigada!!!

Aos meus pais, João e Rosângela Gobbato, as pessoas mais importantes da minha vida, sem dúvida alguma. Obrigada por cuidarem de mim, por investirem em mim e, principalmente, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Nenhuma palavra que eu diga ou escreva, será capaz de chegar à altura do que eu sinto por vocês. Vocês são as pessoas que mais acreditam em mim, apoiam-me em todas as minhas decisões e me incentivam a buscar meus sonhos, obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor e por terem me educado da melhor forma possível com tantos valores maravilhosos, espero um dia conseguir estar à altura de vocês...

Aos meus irmãos, João Humberto e Beatriz Gobbato, que para mim serão sempre “meus pequenos”, obrigada por

tudo, pelas palavras de incentivo, pelas brincadeiras, pelos momentos que passamos juntos. Amo muito vocês.

A todos os meus familiares, inclusive aqueles que infelizmente não estão mais conosco, mas que mesmo assim, sei que torcem por mim de onde estiverem, minha família é muito grande, por isso sintam-se todos agradecidos e com um espaço enorme no meu coração: tios, tias, primos e primas e especialmente minhas avós.

Ao meu namorado Vinicius, por estar ao meu lado sempre e acompanhar de perto todos os momentos que envolveram este trabalho, obrigada pela sua compreensão e pelo seu amor em todos os momentos difíceis desta trajetória, te amo!

Ao meu padrinho, Edson Compagnoli e a minha madrinha de coração, Jocelyne Shimada, ou apenas “Jô”,

como a chamamos, obrigada por estarem sempre presentes em minha vida!

À grande amiga Vera Lúcia, por tantas vezes aliviar minhas dores físicas e emocionais, obrigada pela sua amizade e pelas palavras de incentivo!

À amiga Eliane Martinho por ser uma pessoa tão boa, sempre com palavras que fazem nosso dia tornar-se melhor.

Às três grandes e eternas amigas que sei que posso contar a qualquer hora e com as quais pude contar durante estes 3 anos de trabalho, para desabafar, para chorar, para rir, enfim...para tudo! Claudia Dórea, Mariana Pacheco e Nathália Iezzi, obrigada pela amizade que existe entre nós.

Ao amigo Renato Moschella Magalhães que foi a pessoa que me apresentou ao grupo de pesquisa para fazer o mestrado.

À amiga Camila Mendonça Torres, pelas nossas conversas, desabaços e dúvidas sobre o mestrado!

Às amigas da Oswaldo Cruz, Bruna Pincette e Mayra Paio, por sempre perguntarem sobre esse trabalho e também por sempre me escutarem nos momentos de desabaço!

Às amigas Bárbara Cardoso e Laís Soriano, por sempre se interessarem por essa pesquisa perguntando sobre o andamento do trabalho...gosto muito de vocês!

À minha ex-aluna Flávia Penido, por ser um grande exemplo de pessoa e apaixonada pelo que faz! Obrigada por todas as palavras de incentivo e carinho!

À amiga Flávia Ribas, que teve uma participação fundamental neste trabalho e que além de tudo, me ensinou muitas coisas durante o decorrer deste estudo! Obrigada por me socorrer quando preciso!!

À Stella Napolitano, aluna de iniciação científica, uma das pessoas mais organizadas e comprometidas que já conheci. Teve uma participação reconhecível e merecida neste trabalho.

À Bruna Duarte, pela participação nos momentos iniciais deste estudo.

À Fabiana Reis, por todo seu auxílio nos experimentos e por ter me ensinado praticamente todo o protocolo de inalação.

À secretária Rosana, que não mede esforços para nos ajudar em tudo que precisamos e muitas vezes nos socorrer quando esquecemos algum documento importante no dia da qualificação!

À secretária Elaine que ficou um tempo no lugar da Rosana, sempre muito prestativa e atenciosa com os alunos.

Ao Davi, companheiro de tardes de leitura de lâminas no laboratório!

À Francine, que muitas vezes também ouviu desabaços, medos, angústias e sempre me dando palavras de incentivo!

À Clarice por ter me ajudado com as fotos das lâminas.

À Nathália Pinheiro, que disponibilizou seu tempo para me ajudar com a imunohistoquímica.

Às técnicas da imunohistoquímica, principalmente a Sandra, ou “Sandrinha” como muitos a conhecem, obrigada por não só me ensinar o processo de coloração das lâminas e rever comigo toda a metodologia desta pesquisa, mas por permitir a realização de um “mini-estágio” no laboratório de imunohistoquímica e por estar sempre disposta a nos ajudar e tirar nossas dúvidas a qualquer momento.

À Carla, muito atenciosa, competente e excelente pesquisadora, que não só me deu um tutorial sobre como

utilizar o programa sigma plot, mas que também fez uma revisão minuciosa de cada detalhe do artigo.

Ao professor Milton, que me recebeu de portas abertas no laboratório.

À Iolanda, pela sua ajuda em várias etapas deste trabalho, e por sempre ser uma pessoa prestativa e disposta a ajudar todos que precisam dela, não só profissionalmente, mas também a sempre nos dar uma força com nossos problemas pessoais.

A todos os pesquisadores do LIM-20, que me receberam de portas abertas.

À banca da qualificação, composta pelas professoras Elnara Negri, Vera Capelozzi e Paulina Sannomiya, por

nos ajudar a entender o impacto deste trabalho na comunidade científica.

Às minhas cobaias fofinhas, pois sem elas, nada disso seria possível!

Aos funcionários do biotério, que sempre me ajudavam durante os experimentos.

A todos os professores dos cursos que fiz na pós-graduação, excelentes profissionais que contribuíram muito com meu processo de formação.

Às secretárias do programa de Ciências Médicas, Rose e Angélica, por toda a atenção durante esses 3 anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

E por último, porém não menos importante, a minha orientadora Edna Leick, que é um exemplo não só de pesquisadora, mas de pessoa a ser seguido. Obrigada por ter acreditado em mim em momentos que até eu duvidei que seria capaz e ter me deixado “voar com minhas próprias asas”, sempre me dizendo que eu era capaz e que você confiava em mim. Foi fundamental para meu crescimento, tenho certeza! Obrigada pelo carinho e pela confiança que depositou em mim e neste trabalho!

Epígrafe

A sabedoria do lápis

“O menino observava seu avô escrevendo em um caderno, e perguntou:

- Vovô, você está escrevendo algo sobre mim?

O avô sorriu, e disse ao netinho:

- Sim, estou escrevendo algo sobre você. Entretanto, mais importante do que as palavras que estou escrevendo, é este lápis que estou usando. Espero que você seja como ele, quando crescer.

O menino olhou para o lápis, e não vendo nada de especial, intrigado, comentou:

- Mas este lápis é igual a todos que já vi. O que ele tem de tão especial?

- Bem, depende do modo como você olha. Há cinco qualidades nele que, se você conseguir vivê-las, será uma pessoa de bem e em paz com o mundo – respondeu o avô.

- Primeira qualidade: Assim como o lápis, você pode fazer coisas grandiosas, mas nunca se esqueça que existe uma “mão” que guia os seus passos, e que sem ela o lápis não tem qualquer utilidade: a mão de Deus.

- Segunda qualidade: Assim como o lápis, de vez em quando você vai ter que parar o que está escrevendo, e usar um “apontador”. Isso faz com que o lápis sofra um pouco, mas ao final, ele se torna mais afiado. Portanto, saiba suportar as adversidades da vida, porque elas farão de você uma pessoa mais forte e melhor.

- Terceira qualidade: Assim como o lápis, permita que se apague o que está errado. Entenda que corrigir uma coisa que fizemos não é necessariamente algo mau, mas algo importante para nos trazer de volta ao caminho certo.
- Quarta qualidade: Assim como no lápis, o que realmente importa não é a madeira ou sua forma exterior, mas o grafite que está dentro dele. Portanto, sempre cuide daquilo que acontece dentro de você. O seu caráter será sempre mais importante que a sua aparência.
- Quinta qualidade do lápis: Ele sempre deixa uma marca. Da mesma maneira, saiba que tudo que você fizer na vida deixará traços e marcas nas vidas das pessoas, portanto, procure ser consciente de cada ação, deixe um legado, e marque positivamente a vida das pessoas’.

Autor desconhecido

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Asma Brônquica.....	29
1.1.1 Definição.....	29
1.1.2 Epidemiologia.....	30
1.1.3 Diagnóstico Clínico da asma.....	32
1.1.4 Diagnóstico Funcional da asma.....	33
1.1.5 Diagnóstico da alergia.....	34
1.1.6 Classificação da asma.....	34
1.1.7 Asma grave.....	37
1.1.8 Fisiopatologia da asma.....	38
1.1.9 Parênquima pulmonar e vias aéreas.....	41
1.1.10 Remodelamento.....	44
1.2 Células envolvidas no processo inflamatório.....	45
1.2.1 Mastócitos.....	45
1.2.2 Linfócitos.....	47
1.2.3 Macrófagos.....	48
1.2.4 Neutrófilos.....	50
1.2.5 Eosinófilos.....	51
1.2.6 Quimiocinas.....	54
1.2.6.1 Eotaxinas.....	55
1.2.6.2 RANTES.....	58
1.3 Glicoproteínas na asma.....	60
1.4 Fatores de crescimento.....	61
1.5 Abordagens terapêuticas.....	63
1.5.1 Anti-leucotrienos.....	63
1.5.2 Corticosteroides.....	65
1.5.2.1 NF- κ B.....	67

2. OBJETIVOS.....	70
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
3.1 Grupos experimentais.....	73
3.2 Protocolo de sensibilização.....	74
3.2.1 Tratamento com corticosteroide.....	75
3.2.2 Tratamento com montelucaste sódico.....	75
3.3 Estudo morfológico.....	76
3.3.1 Quantificação de eosinófilos.....	77
3.3.2 Avaliação de células positivas para eotaxina.....	78
3.3.3 Avaliação de células positivas para RANTES.....	79
3.3.4 Avaliação de células positivas para IGF-I.....	80
3.3.5 Avaliação de células positivas para fibronectina.....	80
3.3.6 Avaliação de células positivas para NF- κ B.....	81
3.4 Análise estatística.....	82
4. RESULTADOS.....	83
4.1 Avaliação de eosinófilos.....	84
4.2 Avaliação de células positivas para eotaxina.....	86
4.3 Avaliação de células positivas para RANTES.....	88
4.4 Avaliação de células positivas para IGF-I.....	90
4.5 Avaliação de células positivas para fibronectina.....	92
4.6 Avaliação de células positivas para NF- κ B.....	94
4.7 Análise descritiva dos fragmentos de pulmão.....	96
5. DISCUSSÃO.....	100
6. CONCLUSÕES.....	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno
BAL	Fluido do lavado broncoalveolar
BSA	Soroalbumina bovina
CCL11	Eotaxina-1
CCL5	RANTES
CCL24	Eotaxina-2
CLL26	Eotaxina-3
CCR3	Receptor das eotaxinas
COX	Ciclooxygenase
CV	Capacidade vital, representa o maior volume de ar mobilizado e pode ser medido tanto na inspiração quanto na expiração
CysLTs	Leucotrienos
CysLT1R	Receptores de leucotrienos
DAB	Diaminobenzidina
Datasus	Banco de dados do sistema único de saúde
GR	Receptor de glicocorticoide
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EPO	Peroxidase eosinofílica
EPX/EDN	A proteína X do eosinófilo/neurotoxina derivada do eosinófilo
FENO	Fração do óxido nítrico exalado
FP	Propionato de fluticasona
GINA	Global Initiative National of Asthma
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GR	Receptor de glicocorticoide
Grupo OVA	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina

Grupo OVAD	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com dexametasona
Grupo OVAM	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com montelucaste
Grupo SAL	Animais que receberam inalação com solução salina
HETEs	Ácidos hidroxieicosatetraenoicos
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular
IFN-gama	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IGF-I	Fator de crescimento insulínico
IKB	Família de proteínas inibitórias Kappa-B
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP	Intraperitoneal
LAR	Resposta alérgica tardia
LIM-20	Laboratório de investigação médica
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
LUNA	Método de coloração para avaliação de eosinófilos
MBP	Proteína básica principal
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
MEC	Matriz extracelular
MK-0476	Montelucaste sódico
MMPs	Metaloproteinases
NIH	National Institute of Health
NO	Óxido nítrico
NOex	Óxido nítrico exalado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Solução tampão fosfatada

PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PFE	Avaliação do pico de fluxo expiratório
PGE2	Prostaglandina E2
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia
SO	Ânion superóxido
TCR	Componente do receptor da célula T
TGF- β_1	Fator transformador do crescimento-Beta
TIMPs	Inibidor das metaloproteinases
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
TXA2	Tromboxano A2
VCAM	Molécula de adesão
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VO	Via Oral
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição de prevalência de asma ao redor do mundo.....	31
Figura 2-	Principais parâmetros para classificação da gravidade da asma.....	35
Figura 3-	Cadeia de eventos da resposta alérgica após o contato com o alérgeno.....	40
Figura 4-	Animais controle submetidos à inalação com solução de soro fisiológico.....	75
Figura 5-	Esquema do protocolo de sensibilização utilizado nos experimentos.....	76
Figura 6a-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP da densidade de eosinófilos no parênquima pulmonar distal.....	84
Figura 6b-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP da densidade de eosinófilos nas vias aéreas.....	85
Figura 7a-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP de células positivas para eotaxina no parênquima pulmonar distal.....	86
Figura 7b-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP de células positivas para eotaxina nas vias aéreas.....	87
Figura 8a-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP de células positivas para RANTES no parênquima pulmonar distal.....	88
Figura 8b-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para RANTES nas vias aéreas.....	89

Figura 9a-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para IGF-I no parênquima pulmonar distal.....	90
Figura 9b-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para IGF-I nas vias aéreas.....	91
Figura 10a-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para fibronectina no parênquima pulmonar distal.....	92
Figura 10b-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para fibronectina nas vias aéreas.....	93
Figura 11a-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para NF- κ B no parênquima pulmonar distal.....	94
Figura 11b-	Gráfico de barras representando a média $\pm$ EP das células positivas para NF- κ B nas vias aéreas.....	95
Figura 12-	Fotomicrografias representativas de densidade de eosinófilos ,células positivas para eotaxina, RANTES, IGF-I, fibronectina e NF- κ B nas vias aéreas.....	97
Figura 13-	Fotomicrografias representativas de densidade de eosinófilos ,células positivas para eotaxina, RANTES, IGF-I, fibronectina e NF- κ B no parênquima pulmonar distal.....	99

RESUMO

Objetivos: Comparar os efeitos dos tratamentos com montelucaste e dexametasona no recrutamento eosinofílico e na avaliação de células positivas para eotaxina, RANTES, fibronectina, IGF-I e NF- κ B tanto no parênquima pulmonar distal, quanto nas vias aéreas de cobaias com inflamação alérgica crônica.

Métodos: As cobaias receberam inalação com ovoalbumina (grupo OVA- 2 vezes semanais, durante 4 semanas, totalizando 7 inalações). Após a quarta inalação, as cobaias foram tratadas com montelucaste (grupo OVA-M: 10mg/Kg/VO/dia) ou dexametasona (grupo OVA-D: 5mg/Kg/IP/dia). Após 72 horas da sétima inalação, as cobaias foram anestesiadas e os pulmões foram removidos e submetidos a avaliação histopatológica.

Resultados: Os tratamentos com montelucaste e dexametasona reduziram o número de eosinófilos tanto no parênquima pulmonar distal quanto nas vias aéreas, quando comparados ao grupo OVA ($p<0.05$). No parênquima pulmonar distal, ambos os tratamentos foram efetivos na redução de células positivas para RANTES, NF- κ B e fibronectina, quando comparados ao grupo OVA ($p<0.001$). O tratamento com montelucaste mostrou melhor eficácia na redução de células positivas para eotaxina, quando comparado ao tratamento com dexametasona ($p<0.001$), por outro lado, o tratamento com dexametasona mostrou-se mais significativo na redução de células positivas para IGF-I, quando comparado ao tratamento com montelucaste ($p<0.001$). Nas vias aéreas, ambos os tratamentos foram efetivos na redução de células positivas para IGF-I, RANTES e fibronectina, quando comparados ao grupo OVA ($p<0.05$). O tratamento com dexametasona foi mais efetivo na redução de células positivas para eotaxina e NF- κ B, quando comparado ao tratamento com montelucaste ($p<0.05$).

Conclusões: Neste modelo animal, ambos os tratamentos foram efetivos no controle da resposta inflamatória, tanto no parênquima pulmonar distal, quanto nas vias aéreas.

Palavras-chave: asma, inflamação alérgica crônica, dexametasona, montelucaste.

SUMMARY

Aims: Compare the effects of montelukast or dexamethasone treatments on eosinophilic recruitment, eotaxin, RANTES, fibronectin, IGF-I and NF- κ B positive cells of distal lung parenchyma and also in airway walls of guinea pigs (GP) with chronic allergic inflammation.

Methods: GP were inhaled with ovalbumin (OVA group-2x/week/4weeks). After 4th inhalation, GP were treated with montelukast (M group: 10mg/Kg/PO/day) or dexamethasone (D group: 5mg/Kg/IP/day). After 72 hrs of 7th inhalation, GP were anesthetised, lungs were removed and submitted to histopathological evaluation.

Results: Montelukast and dexamethasone treatments reduced the number of eosinophils both in airway wall as well as in distal lung parenchyma compared to OVA group ($p<0.05$). On distal parenchyma both montelukast and dexamethasone were effective in reducing RANTES, NF- κ B and fibronectin positive cells compared to OVA group ($p<0.001$). Montelukast was more effective in reducing the eotaxin positive cells on distal parenchyma compared to dexamethasone treatment ($p<0.001$), while there was a more expressive reduction of IGF-I positive cells in OVA-D group ($p<0.001$). On airway walls, both montelukast and dexamethasone were effective in reducing IGF-I, RANTES and fibronectin positive cells compared to OVA group ($p<0.05$). Dexamethasone was more effective reducing the number of eotaxin and NF- κ B positive cells than Montelukast ($p<0.05$).

Conclusions: In this animal model, both treatments were effective in modulating the eosinophilic response in distal lung parenchyma and in airway wall, contributing to a better control of the inflammatory response in distal lung parenchyma as well as in airway walls. Dexamethasone treatment induced a greater reduction of NF- κ B expression in airway walls which suggests one of the mechanisms that explains the higher efficacy of this therapeutic approach.

Key words: asthma, chronic airway inflammation, experimental models of asthma, corticosteroids, leukotriene antagonists.

1. *INTRODUÇÃO*

1.1 ASMA BRÔNQUICA

1.1.1 DEFINIÇÃO

Asma é uma palavra grega, que significa ofegante, com dificuldade na respiração. Seu conceito tem sido relatado desde os primórdios da humanidade. Jan Baptista Helmont (1577-1644), um dos discípulos de Paracelsus, sofria de asma e foi o primeiro a relatar que o brônquio parecia ser o principal sítio da doença, associando o broncoespasmo com a inalação de poeira – “o brônquio reage com espasmo à poeira, principalmente de demolições de casas e templos” (Helmont, 1662). Além disso, Helmont descreveu um caso de um monge que, quando ingeria peixe frito em óleo, ficava sem respiração. O consenso de que a asma é uma doença de princípio inflamatório ocorreu somente nas últimas décadas do século XX (Hargreave et al., 1990).

A definição de asma vem sendo constantemente estudada e atualizada com o passar dos anos, sendo um tanto quanto controversa, uma vez que não se sabe exatamente o que causa a asma (a doença pode se desenvolver através de inúmeros fatores), e também porque as principais características patológicas geralmente relatadas e descritas não são específicas para asma (Hargreave e Nair, 2009).

De modo geral, pode-se afirmar que a asma é uma doença crônica caracterizada principalmente por hiper-responsividade brônquica e inflamação pulmonar, particularmente das vias aéreas (Tattersfield et al., 2002), levando então a uma obstrução ao fluxo aéreo, que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento. A hiper-responsividade é a capacidade que um tecido apresenta para responder de forma exagerada a um estímulo, podendo ser específica ou inespecífica. Específica quando for

relacionada a um determinado alérgeno por exemplo, e inespecífica, podendo ser por uma substância que contrai o músculo liso em todas as pessoas (exemplo: acetilcolina). As vias aéreas dos pacientes asmáticos são hiper-responsivas a uma grande variedade de estímulos broncoconstritores (Hashimoto et al., 2002b). Os fatores subjacentes às exacerbações da asma incluem, ingestão de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, infecções virais, exercícios, exposição a alérgenos, entre outros (Lemanske e Busse, 2010). O estreitamento das vias aéreas em resposta a um estímulo não específico é uma das principais características da asma alérgica (Hanazaki et al., 2008), sendo assim, pode-se dizer que, o asmático de modo geral, possui uma hiper-responsividade inespecífica.

A definição mais atual de asma brônquica é elaborada pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA, 2010), baseando o conceito da doença em alterações funcionais da inflamação das vias aéreas: *“A asma é uma doença crônica inflamatória de vias aéreas onde diversas células e elementos celulares desempenham um importante papel. A inflamação crônica causa aumento da hiperresponsividade de vias aéreas que tem como consequência episódios recorrentes de sibilos, dispneia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e pela manhã. Esses episódios estão normalmente associados à obstrução variável ao fluxo que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento”*.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde de 100 a 150 milhões de pessoas no mundo possui diagnóstico de asma brônquica (WHO, 2000). Estima-se que 180.000 pessoas morrem de asma por ano no mundo. De janeiro a agosto de 2011, no

Brasil, as crises asmáticas foram responsáveis por 158 óbitos (Datasus), sendo que 180 destes ocorreram no Estado de São Paulo.

A figura 1 mostra a distribuição de prevalência de asma ao redor do mundo.

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

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

1.1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA ASMA

Para realizarmos a avaliação correta de um paciente com suspeita de asma, é fundamental a anamnese completa do quadro, sendo que para estabelecermos um diagnóstico clínico, são necessárias algumas perguntas fundamentais aos pacientes, como:

- Tem ou teve episódios recorrentes de falta de ar?
- Tem ou teve crises ou episódios recorrentes de chiado no peito?
- Tem tosse persistente, particularmente à noite ou ao acordar?
- Acorda por tosse ou falta de ar?
- Tem tosse, sibilância ou aperto no peito após atividade física?
- Apresenta tosse, sibilância ou aperto no peito após exposição a alérgenos, como mofo, poeira domiciliar, animais ou a irritantes como fumaça de cigarro e perfumes ou após resfriados ou alterações emocionais como riso ou choro?
- Utiliza alguma medicação quando os sintomas ocorrem?
- Há alívio de sintomas após a utilização de medicamentos?

Dentre os sintomas mais relatados pelos pacientes, podemos citar: dispneia, tosse crônica, sibilância, aperto no peito ou desconforto torácico, particularmente à noite ou nas primeiras horas da manhã, alívio após uso de medicamentos broncodilatadores e anti-inflamatórios esteroidais (III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma- SBPT, 2002).

1.1.4 DIAGNÓSTICO FUNCIONAL DA ASMA

Existem alguns testes utilizados no diagnóstico de asma, entre eles a espirometria que nos permite avaliar o grau de obstrução das vias aéreas. São indicativos de asma: obstrução das vias aéreas caracterizada por redução do VEF₁ (inferior a 80% do previsto) e da relação VEF₁/CV (inferior a 75 em adultos e a 86 em crianças), obstrução ao fluxo aéreo que melhora ou desaparece após a utilização de medicamento broncodilatador (aumento do VEF₁ de 7% em relação ao previsto e 200ml em valor absoluto, após a inalação de agonistas b2 de curta duração), aumentos espontâneos do VEF₁ no decorrer do tempo ou após a utilização de medicamentos corticoides (30 a 40mg/dia VO, por duas semanas) de 20%, excedendo 250 ml (Siersted et al., 1996; II Consenso brasileiro sobre espirometria).

A avaliação do pico de fluxo expiratório (PFE) também pode ser utilizada para o diagnóstico funcional no sentido de documentar a obstrução variável do fluxo aéreo. São indicativos da doença: a diferença percentual média entre a maior de três medidas de PFE efetuadas pela manhã e à noite com amplitude superior a 20% em um período de duas a três semanas. Além disso, outro indicativo é o aumento de 20% em adultos e de 30% em crianças no PFE, 15 minutos após o uso de agonistas β 2 de curta duração (Gibson et al., 1995).

1.1.5 DIAGNÓSTICO DA ALERGIA

Existem provas *in vivo* (testes cutâneos) ou *in vitro* (determinação de concentração sanguínea de IgE (específica) capazes de identificar prováveis alérgenos.

A técnica mais comum nos testes cutâneos é a de punção, que utiliza extratos biologicamente padronizados. Em nosso meio, há a predominância de antígenos inaláveis, dentre eles, os que possuem maior importância em casos de asma são os ácaros das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*. Existem outros alérgenos que podem induzir asma como os provenientes de pólen, baratas, epitélio de cães e gatos (Busse e Lemanske, 2001).

O teste que determina a concentração de IgE sérica específica pode confirmar e complementar os resultados dos testes cutâneos, sendo assim, é capaz de fornecer dados mais quantitativos, porém, por ser mais oneroso, não é recomendado com frequência (Busse e Lemanske, 2001).

1.1.6 CLASSIFICAÇÃO DA ASMA

A classificação correta da doença auxilia na escolha do melhor tratamento efetivo, sendo que a asma pode ser classificada quanto à gravidade em intermitente e persistente leve, moderada e grave.

Há a estimativa de que 60% dos casos de asma sejam intermitentes ou persistentes leves, 25% a 30% moderados e de 5% a 10% graves (III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma SBPT, 2002).

A análise usual da gravidade da asma pode ser realizada pela avaliação da frequência e intensidade dos sintomas e pela função pulmonar. A medicação necessária para estabilização do quadro sintomático, a tolerância a atividades físicas, a frequência de visitas ao consultório médico e ao pronto-socorro, a quantidade de internações por asma e a necessidade de ventilação mecânica são aspectos utilizados para classificar a gravidade dos casos asmáticos (Cockcroft et al., 1996).

A figura 2 apresenta os principais parâmetros utilizados para classificar a gravidade da asma.

QUADRO 2 Classificação da gravidade da asma				
	Intermitente	Persistente leve	Persistente moderada	Persistente grave
Sintomas falta de ar, aperto no peito, chiado e tosse	≤ 1 vez/semana	≥ 1 vez/semana e < 1 vez/dia	Diários mas não contínuos	Diários contínuos
Atividades	Em geral normais Falta ocasional ao trabalho ou escola	Limitação para grandes esforços Faltas ocasionais ao trabalho ou escola	Prejudicadas Algumas faltas ao trabalho ou escola. Sintomas com exercício moderado (subir escadas)	Limitação diária Falta freqüente ao trabalho e escola. Sintomas com exercícios leves, (andar no plano)
Crises*	Ocasionais (leves) Controladas com broncodilatadores, sem ida à emergência	Infreqüentes Algumas requerendo curso de corticóide	Freqüentes Algumas com ida à emergência, uso de corticóides sistêmicos ou internação	Freqüentes – graves Necessidade de corticóide sistêmico, internação ou com risco de vida
Sintomas noturnos**	Raros ≤ 2 vezes/mês	Ocasionais > 2 vezes/mês e ≤ 1 vez/semana	Comuns > 1 vez/semana	Quase diários > 2 vezes/semana
Broncodilatador para alívio	≤ 1 vez/semana	≤ 2 vezes/semana	> 2 vezes/semana e < 2 vezes/dia	≥ 2 vezes/dia
PFE ou VEF₁ nas consultas	Pré-bd > 80% previsto	Pré-bd ≥ 80% ou previsto	Pré-bd entre 60% e 80% previsto	Pré-bd < 60% previsto
* Pacientes com crises infreqüentes, mas que coloquem a vida em risco, devem ser classificados como portadores de asma persistente grave. ** Despertar noturno regular com chiado ou tosse é um sintoma grave.				

Figura 2. Principais parâmetros para classificação da gravidade da asma.(III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma- SBPT, 2002).

1.1.7 ASMA GRAVE

Ao longo dos últimos anos, tem se tornado evidente que apesar da eficácia das terapias já existentes para o controle da asma, ainda há um pequeno grupo de pacientes asmáticos, que apesar de receber acompanhamento especializado e tratamento contínuo adequado, continua a ter sintomas persistentes, alterações da função pulmonar e exacerbações frequentes (Wenzel et al., 2003; Fonseca e Botelho, 2006).

Algumas formas de tratamento de asma grave vêm sendo discutidas englobando a utilização de doses relativamente altas de corticosteroides e diferentes níveis de sintomas, função pulmonar e exacerbações. A asma atinge proporção significativa de pessoas nos países desenvolvidos, mas o impacto da doença na vida cotidiana destes pacientes é bastante controlado devido ao fato de a maioria possuir asma intermitente ou leve (Fonseca e Botelho, 2006).

Estima-se que cerca de 10% dos pacientes asmáticos possui sintomas e limitações importantes, exacerbações frequentes ou redução persistente da função respiratória. Apesar de receberem cuidados contínuos, são responsáveis pela maioria dos custos não programados por asma e internações (Moore e Peters, 2006). Sendo assim é possível associarmos que esta porcentagem de pacientes seja responsável por grande parte dos custos associados à doença. Já foi relatado que os custos diretos relacionados com a asma grave são cerca de oito vezes maiores aos da asma intermitente e mesmo duas vezes superiores aos da asma moderada (Godard et al., 2002; Fonseca, 2003; Fonseca e Botelho, 2006).

Embora o conceito de asma grave esteja mais relacionado às características intrínsecas da doença, o conceito de asma de difícil controle preocupa-se mais diretamente com os cuidados de saúde, com a prática clínica “na vida real” e abrange situações clínicas como a existência de doenças concomitantes, a má aderência à

terapêutica, a inacessibilidade a cuidados de saúde ou a contribuição de fatores psicológicos (Fonseca e Botelho, 2006).

De acordo com o GINA (2010), a asma persistente grave pode ser definida pela presença de pelo menos um dos indicadores: sintomas diários, exacerbações frequentes, sintomas frequentes de asma noturna (várias vezes por semana), limitação nas atividades físicas, VEF_1 ou PFE $\leq 60\%$ do previsto ou variabilidade do PFE ou $VEF_1 > 30\%$. Estes indicadores foram definidos para os doentes sem tratamento.

O tratamento farmacológico da asma persistente grave foi baseado em corticosteroides inalados ($>1000 \mu\text{g}/\text{dia}$ de beclometasona ou equivalente) e na administração de um beta-2 agonista de longa ação e, se necessário, um ou mais dos seguintes: teofilina de liberação prolongada, antagonista dos leucotrienos, agonista oral de longa ação, corticosteróide oral (Fonseca e Botelho, 2006).

Alves et al. (2008) realizaram um estudo retrospectivo com 111 pacientes para estabelecer os fenótipos clínicos em portadores de asma grave, avaliando adesão ao tratamento e controle da doença por dados clínicos e funcionais. Concluíram que um número significativo de portadores de asma grave não adere ao tratamento. Muitos pacientes com asma grave têm obstrução irreversível, mas o fenótipo clínico mais relevante é constituído pelos pacientes resistentes ao tratamento habitual.

1.1.8 FISIOPATOLOGIA DA ASMA

O processo de sensibilização da asma inicia-se com as células dendríticas apresentando o antígeno aos linfócitos T $CD4^+$ não estimulados (naive). Com essa apresentação, ocorrerá diferenciação linfocitária com a geração de linfócitos Th2 que

secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF, entre outras, que promoverão a produção de imunoglobulina E (IgE), recrutarão linfócitos T CD4+, mastócitos, basófilos e eosinófilos,, desencadeando assim, uma resposta inflamatória nas vias aéreas (GINA, 2010).

Após a sensibilização ao alérgeno e ocorrendo novas e repetidas exposições aos agentes desencadeantes, os indivíduos alérgicos desenvolvem uma resposta caracterizada principalmente por obstrução das vias aéreas. Esta resposta atinge seu pico de intensidade máxima em 10 a 20 minutos e pode durar cerca de 2 horas, recebendo o nome de resposta imediata, caracterizada pela rápida ativação de mastócitos e basófilos nas vias aéreas. As células ativadas liberam mediadores que induzem contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudação de plasma, comprometendo a integridade epitelial (Bousquet et al., 2000). A histamina e os leucotrienos parecem ser os principais mediadores responsáveis pelas alterações encontradas nesta resposta imediata (Holgate e Finnerty, 1988; Harris et al., 1995).

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

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

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

O processo inflamatório na asma resulta de uma interação altamente complexa de vários tipos celulares. Nos aspectos inflamatórios da doença, os processos alérgicos direcionados por IgE são as características principais da patologia das vias aéreas, sendo mastócitos, linfócitos Th2 e eosinófilos consideradas as células mais importantes (Lemanske e Busse, 2010). Além destas células inflamatórias, macrófagos e células teciduais estruturais também exercem importante função através da liberação de diversos mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas (Chung e Barnes, 1999).

O processo de recrutamento eosinofílico é considerado extremamente complexo e envolve quimiocinas como eotaxinas e RANTES. Além disso, uma ampla variedade de fatores de crescimento estão envolvidos na patogênese da asma, incluindo o fator de crescimento insulínico IGF-I que parece estar com os níveis elevados durante a inflamação alérgica (Pascual et al., 2005), sendo um contribuinte para o processo de remodelamento (Verardi et al., 2009). Durante o processo de inflamação alérgica, devemos considerar também, a integridade da matriz extracelular e suas proteínas, como a fibronectina que será discutida posteriormente neste trabalho.

Sendo assim, a patogênese da asma envolve a expressão de várias células inflamatórias e também de uma ampla série de proteínas inflamatórias, que incluem quimiocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição e a presença de glicoproteínas, que serão discutidas no decorrer deste trabalho.

1.1.9 PARÊNQUIMA PULMONAR E VIAS AÉREAS

Pela própria definição, segundo GINA (2010), a asma é uma inflamação crônica de vias aéreas e em consequência da inflamação as vias aéreas tornam-se hiper-reativas e estreitam-se facilmente em resposta a inúmeros estímulos. Nas vias aéreas de pacientes asmáticos, normalmente encontramos aumento de secreção que obstrui a luz da via aérea, e sua parede encontra-se com níveis de eosinófilos e linfócitos acima do normal, acompanhada de vasodilatação, fragilidade microvascular e rompimento epitelial. A inflamação presente nas vias aéreas não é restrita apenas às vias aéreas superiores e pode acometer toda a árvore brônquica, inclusive as pequenas vias aéreas. Este tipo de

inflamação de pequenas vias aéreas é encontrado em quase todos os tipos de asma, independente do grau de gravidade da doença (Diamant, 2009).

Já foi observada a presença de infiltração de macrófagos e eosinófilos em vias aéreas distais, principalmente em região de tecido alveolar de humanos (Kraft et al., 1996). Leick-Maldonado et al. (1997) descreveram, ao estudar a distribuição de fibras do sistema elástico em vias aéreas intraparenquimatosas normais e broncoconstritas de cobaias que há um mecanismo de delaminação destas fibras dentro da camada subepitelial, e que parte delas permanece aderida à membrana basal e portanto, seguindo as invaginações da mucosa da via aérea que ocorrem no broncoespasmo, enquanto a outra permanece adjacente ao músculo liso da via aérea. Esta configuração é compatível com o que se observa nas vias aéreas broncoconstritas de asmáticos e com a teoria de que as fibras do sistema elástico têm participação na modulação da broncoconstrição.

Considerando a asma fatal, Mauad et al. (2004) estudaram 15 pacientes que foram a óbito por crises asmáticas e observaram a diminuição da quantidade de fibras elásticas em pequenas vias aéreas, que são essenciais para a manutenção do recolhimento elástico pulmonar, sugerindo que tal fator poderia contribuir para o desfecho fatal observado nestes pacientes.

Além disso, há a existência de receptores de alta afinidade para cisteinil leucotrienos nas vias aéreas periféricas ou distais. (Bjermer ,2001). É de grande importância estudarmos a inflamação de vias aéreas periféricas pois devemos levar em consideração que muitos dos dispositivos utilizados para administração de esteróides inalatórios geram partículas que não chegam efetivamente às vias aéreas distais e ao parênquima pulmonar, sendo depostos principalmente em vias aéreas centrais (Kraft, 2007). Estes fatos chamam a atenção, para a ocorrência de subtratamento da doença.

É importante ressaltar também que etapas fundamentais do remodelamento pulmonar parecem ocorrer principalmente em pequenas vias aéreas (Dolhnikoff et al., 2009), enfatizando a importância de controlar a inflamação de vias aéreas para que seja possível atingir um controle da inflamação alérgica na asma.

A importância do parênquima pulmonar na asma tem sido evidenciada e discutida com o passar dos anos, pois além das vias aéreas, foi constatado que o parênquima pulmonar também sofre alterações importantes na asma (Yanai et al., 1992; Wagner et al., 1998).

Antes, acreditava-se que a inflamação alérgica estava restrita somente às vias aéreas, porém, recentemente, vários autores observaram em modelos experimentais que o parênquima periférico pulmonar, ou parênquima distal, apresentava uma importante inflamação eosinofílica, além de expressão aumentada de IL-5 e processos de remodelamento pulmonar. Além disso, compreender e reconhecer que a resposta alérgica ocorre também no parênquima pulmonar é extremamente importante para compreendermos o conjunto de alterações que ocorrem no pulmão como um todo, fazendo com que o parênquima distal tenha sido intensamente enfatizado e discutido em casos de asma grave (Minshal et al., 1998; De Magalhães, 2005; Lanças et al., 2006).

Em modelos experimentais, particularmente nos desenvolvidos em nosso laboratório, também foi possível observar alterações de pulmão distal. Lanças et al. (2006) e Nakashima et al. (2008) observaram que, além das alterações nas respostas de mecânica do sistema respiratório, pode ocorrer também aumento na responsividade do tecido pulmonar de cobaias com inflamação crônica de vias aéreas, observada através de curva dose-resposta específica (com ovoalbumina) e inespecífica (metacolina) em sistema de mecânica pulmonar oscilatória. Em relação ao remodelamento pulmonar, foi

verificado aumento do conteúdo de colágeno e de actina no parênquima em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias.

Xisto et al. (2005) evidenciam que a inflamação eosinofílica, as alterações mecânicas, assim como o remodelamento, não ocorrem apenas nas vias aéreas, mas também no parênquima pulmonar, levando a alterações mecânicas tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

1.1.10 REMODELAMENTO

O termo Remodelamento é utilizado para expressar modificações estruturais que ocorrem nos pulmões, normalmente em situações patológicas decorrentes do processo inflamatório (Vignola et al., 2003).

Após episódios recorrentes de inflamação crônica e de falta de reparo adequado à injúria, surge o que chamamos de remodelamento pulmonar, talvez uma tentativa desenfreada do organismo de tentar reparar o dano tecidual ocasionado pela inflamação. O remodelamento contribui para que não haja a total reversibilidade da obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas (Tiddens et al., 2000; Vignola et al., 2003).

Uma série de eventos ocorrem no processo de remodelamento da asma brônquica, como hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa das vias aéreas (Ebina et al., 1993), aumento das glândulas mucosas, aumento no número de células de clara no epitélio das vias aéreas (Laitinen et al., 1993), alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular - MEC (Principais proteínas: fibras colágenas, elásticas, proteoglicanos e glicoproteínas), podendo levar a espessamento da membrana basal (i.e. depósito de colágeno I, III e fibronectina na região abaixo da membrana basal

epitelial - lâmina reticular) (Roche et al., 1989), maior número de miofibroblastos com aumento na deposição de colágeno (Roche et al., 1989), aumento no número de vasos sanguíneos e alterações estruturais no parênquima (Kumar, 2001).

O arranjo da MEC envolve processos dinâmicos de produção e degradação de proteínas da matriz e está relacionado ao processo de remodelamento pulmonar presente em diversas situações fisiopatológicas, como a asma brônquica. As metaloproteinases (MMPs), os inibidores de metaloproteinases (TIMPs) e os fatores de crescimento são fundamentais para o controle destes processos (James, 2005). O remodelamento prejudica a integridade da MEC e sua composição torna-se completamente desordenada, e na asma, quando este equilíbrio é prejudicado, resulta em quantia anormal da matriz depositada assim como composição alterada dos seus componentes agravando então, o quadro de inflamação alérgica.

1.2 CÉLULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

1.2.1 MASTÓCITOS

A ativação dos mastócitos tem papel central na fase imediata da asma, levando a respostas localizadas envolvendo formação de edema, inchaço tecidual e broncoconstrição. Os mastócitos são células encontradas em tecidos e sofrem diferenciação *in situ*. Seu citoplasma contém grânulos intracitoplasmáticos e corpos lipídicos (Busse, 1998a).

Os mastócitos são células grandes, que se originam na medula óssea, entram na circulação como células mononucleares CD34+ e migram para lugares de mucosa e submucosa nas vias aéreas, passando por maturação específica para o tecido (Galli, 1997). Uma das características dos mastócitos é a presença de receptores de alta afinidade para IgE. A ativação mastocitária é desencadeada através da ligação IgE da membrana citoplasmática da célula ou como resposta à ação de citocinas (Busse, 1998a). Existe uma correlação entre os níveis de IgE e a expressão de receptores de alta ou baixa afinidade em diferentes populações celulares particularmente em mastócitos e basófilos. Níveis altos de IgE aumentam o número de receptores e, portanto, aumentam o potencial de desgranulação destas células (Broide, 2001).

Em roedores, os mastócitos maduros podem assumir dois tipos de fenótipos, um deles é um fenótipo encontrado em tecido conjuntivo, e esses mastócitos de tecido conjuntivo, apresentam heparina como seu principal proteoglicano e produzem grandes quantidades de histamina (Abbas et al., 2000).

No fluido do lavado broncoalveolar e também no epitélio de pacientes asmáticos fora da crise aguda, ocorre aumento no número de mastócitos (Gibson et al., 1993; Laitinen et al., 1993; Pesci et al., 1993).

Os mastócitos produzem diversos mediadores que perpetuam a resposta inflamatória de vias aéreas, tais como tromboxanos, leucotrienos B₄ e D₄ e, além disso, são os principais responsáveis pela liberação de IL-4 e do fator de necrose tumoral (Holgate e Finnerty, 1988) que atuam como quimiotáticos e ativam eosinófilos e linfócitos.

1.2.2 LINFÓCITOS

Os linfócitos exercem papel fundamental na fisiopatogenia da asma. O linfócito T é capaz de coordenar e executar respostas imunológicas protetoras e adaptativas específicas desencadeadas por antígenos. A classificação dos linfócitos depende da molécula que estas células podem expressar em sua superfície, e no caso da célula T, são subclassificadas pelas citocinas que podem secretar. As células T expressam o marcador de superfície CD3 (designadas como células -T CD3+), um componente do receptor da célula-T (TCR) utilizado para reagir ao antígeno externo (Walker et al., 1992; Wilson et al., 1992).

Os linfócitos CD3+ possuem duas principais subpopulações: as de marcadores de superfície CD4 ou CD8, que agem como co-receptores para peptídeos antigênicos apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, presentes nas células apresentadoras de antígenos. (Abbas, 2000).

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

Os linfócitos Th2 ativados orquestram a cascata inflamatória. Quando ativada, a célula Th2 libera interleucinas, tais como IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 estimula os linfócitos a secretarem IgE, que então se liga à superfície dos mastócitos (Hendeles et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010).

WALKER et al. (1991) encontraram no sangue e no lavado broncoalveolar (BAL), uma correlação significativa entre a ativação das células T, eosinofilia e gravidade da asma, medida pela diminuição do VEF₁ pela curva dose resposta à metacolina. Neste

contexto, AZZAWI et al. (1990) realizaram biópsias endobrônquicas de pacientes asmáticos estáveis e mostraram aumento de linfócitos T ativados (linfócitos CD25+), particularmente da subpopulação CD4+ e eosinófilos na parede brônquica de pacientes asmáticos com quadro estável. Estes eosinófilos foram então corados positivamente para EG₂ (índice de secreção da proteína catiônica eosinofílica). Os achados sugerem que em pacientes com quadro asmático estável também existe a presença de sinais de inflamação crônica de vias aéreas. Diante disso, Corrigan e Kay (1991) também encontraram sinais de ativação de células T CD4+ circulantes em pacientes asmáticos.

1.2.3 MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células abundantes na luz brônquica, em indivíduos normais e também em pacientes asmáticos, liberando uma ampla diversidade de mediadores inflamatórios, incluindo, fatores de crescimento, enzimas (PAF, lisozima, collagenase e elastase) e eicosanóides (leucotrienos LTB₄ e LTC₄) . Não apenas os macrófagos alveolares, mas também os macrófagos das vias aéreas podem atuar como células apresentadoras de antígenos (APCs) e exibem receptores de membrana que se ligam a IgG e IgE e interagem com alérgenos, ativando-os e liberando uma série de mediadores (Arnoux et al., 1987).

Na inflamação aguda, os macrófagos secretam mediadores, como TXA₂, PGE₂, PAF, LTB₄, LTD₄, 5-HETE, ânion superóxido (SO) e a IL-6 após teste de provocação alérgica. As citocinas IL-10, IL-8, IL-1, TNF α , GM-CSF, PDGF (*platelet derived growth factor*), EAF(*eosinophil-activating factor*) e IFN- γ são secretadas no quadro de inflamação alérgica crônica (Lane et al., 1994).

1.2.4 NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são células de formato redondo com cerca de 7 micra de diâmetro e facilmente detectados no esfregaço sanguíneo periférico devido ao formato de seu núcleo, motivo pelo qual recebeu a designação inexata de polinucleares, quando na verdade trata-se apenas de um único núcleo com várias zonas estreitadas, formando pontes de substância nuclear. O citoplasma ligeiramente acidófilo é constituído de grânulos heterogêneos. Os neutrófilos estão presentes principalmente nos pacientes com asma persistente moderada e severa e também nas exacerbações da doença. Embora o seu papel na patogênese da asma leve não tenha sido elucidado, existem evidências que sugerem também a sua participação no processo inflamatório brônquico de pacientes com asma leve intermitente e persistente (Green et al., 2002).

Simpson et al (2006), estudando o escarro induzido, analisaram os subfenótipos inflamatórios de uma população de cerca de 93 pacientes com asma, com idade média de 42 anos (18-77), VEF1 de $76\% \pm 20$, detectaram 41% de pacientes com asma eosinofílica, 20% neutrofílica, 8% mista e 31% paucigranulocítica. A asma "neutrofílica" acomete pacientes mais velhos (geralmente acima de 25 anos), com um número total de células inflamatórias elevado, quando comparado ao de pacientes com padrão eosinofílico (Simpson et al., 2006). É mais comum em mulheres e em pacientes não-atópicos (Green et al., 2002).

1.2.5 EOSINÓFILOS

Até os anos 1980 acreditava-se que os eosinófilos apresentassem ação anti-inflamatória. Após o reconhecimento da alta toxicidade das proteínas contidas nos grânulos dos eosinófilos, este falso conceito modificou-se.

Atualmente, sabe-se que os eosinófilos desempenham papel fundamental no quadro de inflamação alérgica, sendo considerado o tipo celular predominante no infiltrado inflamatório e mais importante na fisiopatologia da asma (Kay, 2005).

O eosinófilo maduro normalmente possui formato redondo ou ovóide, possuindo núcleo bilobulado e contendo diâmetro em torno de 12-17 μ . Por conter inúmeros grânulos de tamanhos variados em sua constituição, são chamados de granulócitos, são produzidos na medula óssea, sendo a célula precursora a mesma dos basófilos e já no início do seu desenvolvimento também expressam o antígeno CD34+ (Venge et al., 1996; Kroegel et al., 1994).

Alguns tipos de grânulos destacam-se nos eosinófilos e, através da microscopia eletrônica, é possível identificar as principais características contidas nestes grânulos, podendo ser peroxidase-positivos ou peroxidase-negativos.

Os grânulos peroxidase-positivos estocam as três principais proteínas catiônicas dos eosinófilos: a proteína X do eosinófilo/neurotoxina derivada do eosinófilo (EPX/EDN) (*do inglês* “eosinophil protein X” e “eosinophil-derived neutotoxin”), a proteína catiônica eosinofílica (ECP – *do inglês* “eosinophil cationic protein”) e a proteína básica principal (MBP – *do inglês* “major basic protein”), enquanto que os grânulos peroxidase-negativos estocam apenas ECP e EPX/EDN (Venge, 1998).

Os grânulos peroxidase-positivos possuem alto peso molecular devido à presença de cristais, formados por MBP (*do inglês* “major basic protein”) (Venge, 1998). Nos eosinófilos de cobaias, a MBP, constitui cerca de 50 a 55% do conteúdo protéico dos grânulos, sendo assim, é considerada a proteína dominante. Esta proteína, possui um papel fundamental na fisiopatogenia da asma, pois dentre as suas principais funções biológicas podemos citar a citotoxicidade, sendo lesiva até mesmo em baixas concentrações, para o epitélio brônquico de cobaias e também de seres humanos (Frigas et al., 1980; Gleich e Adolphson, 1986). A MBP é capaz de estimular a liberação de histamina por mastócitos (Zheutlin, 1984), sugerindo que possa existir uma interação entre os eosinófilos e mastócitos e, além disso, A MBP é antagonista de receptores muscarínicos (Fryer et al., 2000).

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) já foi detectada em eosinófilos ativados em muitos órgãos, apresentando atividade citotóxica contra o epitélio brônquico e sua presença encontra-se elevada na submucosa e no epitélio de pacientes asmáticos (Azzawi et al., 1990; Bousquet et al., 1990; Djukanovic et al., 1990b).

No escarro de pacientes asmáticos e no fluido do lavado broncoalveolar, os níveis de ECP também estão aumentados, sugerindo que o aumento deste nível esteja correlacionado com a gravidade clínica e com a intensidade da hiperresponsividade brônquica (Coyle et al., 1994).

A peroxidase eosinofílica (EPO) está envolvida na inativação de mediadores lipídicos, como os leucotrienos, sendo tóxica para o epitélio brônquico, podendo causar paralisia ciliar. Outra característica importante da EPO é o fato de ela ser capaz de induzir a liberação de histamina de mastócitos e causar agregação plaquetária (Yoshikawa et al., 1993).

O potencial lesivo da proteína X do eosinófilo (EPX) ou neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) para o epitélio brônquico ainda não foi muito bem elucidado.

A liberação de mediadores inflamatórios é responsável pela migração de eosinófilos (que liberam MBP, ECP, EPO, mediadores lipídicos e citocinas), linfócitos T (que liberam diversas citocinas) e neutrófilos (que liberam elastase), caracterizando o início da fase tardia da resposta asmática (Schuiling et al., 1998). Estes mediadores atuam, portanto, na manutenção da inflamação e no remodelamento pulmonar.

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

Existe uma importante relação entre a gravidade da asma, o grau de eosinofilia e o número de eosinófilos ativados (Bousquet et al., 2000). Após essa ativação, ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas e fenotípicas destas células. Os eosinófilos encontrados no sangue periférico e no lavado broncoalveolar apresentam fenótipos diferentes (Mengelers et al., 1994).

O acúmulo eosinofílico nos sítios de inflamação alérgica envolve várias etapas, sendo o processo de migração eosinofílica até o local da lesão bastante complexo. O eosinófilo é atraído ao local de lesão através de fatores quimiotáticos (Venge, 1993) sendo grande a quantidade de substâncias que podem atrair estas células até os sítios

de inflamação, dentre elas podemos destacar as quimiocinas, como RANTES e eotaxinas (Teran, 2000).

A próxima etapa é a adesão às células endoteliais, seguida de transmigração através da parede vascular e migração através das estruturas teciduais. O recrutamento eosinofílico resulta dos complexos mecanismos que envolvem interação com moléculas de adesão e proteínas da matriz extracelular (Bochner, 1997). Em pacientes asmáticos, após a migração transendotelial, os eosinófilos aderem ao epitélio brônquico onde desgranulam-se, liberando substâncias (ECP, MBP, EPO e superóxido), que são altamente tóxicas para as células epiteliais (Takizawa et al., 1997).

Quando ativados, os eosinófilos expressam grande número de receptores para citocinas, quimiocinas, imunoglobulinas e células do sistema complemento, como a célula C5a, considerada fundamental na ativação de eosinófilos, pois induzem a liberação de seus grânulos tóxicos e também de radicais livres que causam dano aos tecidos das vias aéreas (Elsner, 1999).

Grande parte das citocinas que regulam o infiltrado eosinofílico é produzida pelos linfócitos (Robinson et al., 1993) e muitas delas podem atuar como antiapoptóticas para os eosinófilos, aumentando assim sua sobrevivência (Yousefi et al., 1996), o que representa um mecanismo que permite a compreensão do acúmulo específico de eosinófilos na asma brônquica (Simon et al., 1996).

1.2.6 QUIMIOCINAS

Como já abordado anteriormente, a patogênese da asma, além de envolver diversas células inflamatórias, também envolve a expressão de uma ampla série de

proteínas inflamatórias, incluindo, citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e adesão de moléculas. O aumento da expressão da maioria destas proteínas resulta de aumento na transcrição genética. Muitos destes genes não são expressos em células normais sob condições habituais e quando não há um processo inflamatório, mas, em condições anormais, como por exemplo, nas patologias inflamatórias, sua produção aumenta por um mecanismo celular-específico. O padrão de expressão da citocina determina em grande parte, não apenas a natureza, mas também a persistência da resposta inflamatória (Barnes, 1994).

1.2.6.1 EOTAXINAS

As vias aéreas de pacientes com inflamação alérgica possuem infiltrado de eosinófilos relevante. Essas células são conhecidas por contribuir com o processo inflamatório através da liberação de proteases tóxicas, mediadores inflamatórios e radicais de oxigênio. Em 1994, a eotaxina 1 foi isolada no lavado broncoalveolar (BAL) de cobaias que foram expostas a alérgenos (desafio) (Barrett, 1997; Jose et al., 1994). A presença destas citocinas no BAL estava altamente associada com a infiltração de eosinófilos presentes nas vias aéreas de cobaias.

Os efeitos *in vitro* da eotaxina 1 sobre os eosinófilos incluem desgranulação e liberação de IL-4, alta regulação de CD11b, quimiotaxia, indução e liberação de espécies reativas de oxigênio e migração transendotelial (Stellato et al., 2001; Clemetson et al., 2000; Yasmin et al., 2001). Existem evidências de que a eotaxina 1 também está envolvida, juntamente com a IL-5, no processo de recrutamento de eosinófilos até os

sítios de inflamação, sendo que a IL-5 está mais envolvida na diferenciação e liberação destas células na medula óssea e as eotaxinas estariam direcionando os eosinófilos circulantes até o local da inflamação (Leckie et al., 2000). A eotaxina 1 também possui atividade quimiotática para linfócitos e basófilos (Palframan et al., 1998a; Palframan et al., 1998b).

Como já visto anteriormente, o processo de recrutamento eosinofílico, envolve uma série de etapas separadas, em um primeiro momento, adesão ao endotélio e migração transendotelial, dependentes da expressão de moléculas de adesão e posteriormente migração através da matriz extracelular ao sítio de inflamação alérgica dependente de estímulos quimiotáticos.

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas que desempenham papel fundamental na resposta inflamatória e imune devido à ativação e atração dos leucócitos através de receptores transmembranas acoplados a proteínas G (Tiffany et al., 1998; Jose et al., 1994).

As quimiocinas dividem-se em quatro famílias (CXCL, CCL, CL e CX₃CL), o que determina o tipo de cada uma é a posição de um dos resíduos de cisteína localizados na cadeia amino-terminal. Na família CXCL, os dois resíduos de cisteína encontram-se separados por um aminoácido, nas CCL os dois resíduos encontram-se adjacentes. A família CL possui apenas um resíduo de cisteína enquanto que a família CX₃CL possui três aminoácidos entre as duas cisteínas (Barrett et al., 1997).

Dentro da família CCL, encontram-se três peptídeos com atividade quimiotática específica para eosinófilos conhecidos como eotaxina-1, eotaxina-2 e eotaxina-3. De acordo com a nomenclatura das quimiocinas, podemos classificá-las da seguinte maneira: CCL11 (eotaxina-1), CCL24 (eotaxina-2) e CCL26 (eotaxina-3). Devido a sua

ação específica sobre os eosinófilos, pode-se afirmar que as eotaxinas desempenham um papel relevante no quadro inflamatório alérgico (Jose et al., 1994).

A eotaxina 1 vem sendo estudada em diversos modelos animais experimentais de asma. Já foi observado que de 3 a 6 horas após desafio com alérgeno há aumento significativo no nível dos genes que codificam para esta citocina, em ratos que foram expostos a alérgenos (Jose et al., 1994).

Gonzalo et al. (1998) demonstraram que a administração de eotaxina 1 em aerossol induz o fluxo de eosinófilos nas vias aéreas de ratos. Além disso, ratos deficientes em eotaxina 1 apresentam redução de recrutamento eosinofílico, além de diminuição no quadro inflamatório.

Em humanos, a eotaxina 1 está altamente relacionada a doenças respiratórias de fundo alérgico como a rinite alérgica e a asma brônquica. A expressão do gene que codifica a eotaxina 1 encontrou-se elevada em biópsias brônquicas, escarro, lavado broncoalveolar e soro derivado de pacientes asmáticos (Lamkhieoued et al., 1997; Nakamura 1999; Ying et al., 1999; Hadjicharalambous et al., 2004; Tateno et al., 2004).

Brown et al. (1998) demonstraram que 4 horas após o desafio com alérgeno os níveis de eotaxina 1 atingem concentrações máximas e em torno de 24 horas essas concentrações começam a entrar em declínio. Já a IL-5 possui uma cinética diferente, sendo que após o desafio com alérgeno os níveis de IL-5 no lavado broncoalveolar aumentam gradativamente, atingindo seu pico de concentração em torno de 24 horas (Teran et al., 1999), sugerindo que as eotaxinas estão diretamente envolvidas com o recrutamento de eosinófilos em um momento inicial, e que a IL-5 estaria mais relacionada com a manutenção da migração destas células no pulmão (Teran et al., 2006).

As eotaxinas exercem seu efeito através da ligação específica com receptores transmembrana acoplados a proteína G, os quais recebem o nome de CCR3 (Heath et al., 1997; Fujisawa, 2000;). Este receptor é expresso principalmente em eosinófilos e basófilos, podendo ser encontrado em menores quantidades em outros tipos celulares como por exemplo: linfócitos Th2, mastócitos, células dendríticas e células epiteliais (Teran et al., 2006).

O receptor CCR3 parece ser um alvo promissor para futuras pesquisas nesta área, pois alguns estudos já relatam que o uso de medicamentos antagonistas de CCR3 pode exercer efeitos benéficos em doenças alérgicas (Teran et al., 2006).

1.2.6.2 RANTES

Assim como as eotaxinas, RANTES, do inglês *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted* (CCL5), também é considerado membro da família das quimiocinas, contribuindo para o desenvolvimento do processo inflamatório alérgico através do recrutamento de eosinófilos.

Em modelos experimentais de inflamação alérgica, RANTES, além de outras substâncias, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 desempenham papel fundamental na migração eosinofílica em vias aéreas (Romagnani., 2002).

RANTES é capaz de induzir a migração de leucócitos através da ligação em receptores específicos da proteína G (Zlotnik et al., 2000). *In vitro*, RANTES mostrou-se capaz de mediar a quimiotaxia de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos (Schall et al., 1990; Schall, 1991; Kameyoshi et al., 1992; Lukacs et al., 1996), além de promover

uma série de eventos pró-inflamatórios, como por exemplo a ativação de integrinas (Bischoff et al., 1993; Taub et al., 1996).

A produção de RANTES se dá predominantemente por células T CD8+, células epiteliais e fibroblastos (Matsukura et al., 1998; Olszewska et al., 1998; Schall et al., 1988). *In vivo*, RANTES possui uma expressão constitucional no pulmão de pacientes asmáticos (Berkman et al., 1996; Folkard et al., 1997), e níveis elevados desta quimiocina são encontrados no BAL de pacientes asmáticos (Alam et al., 1996; Folkard et al., 1997).

O papel de RANTES na inflamação alérgica tem sido estudado nos últimos anos, porém seu desempenho e sua exata contribuição para o processo inflamatório ainda é algo controverso. Há evidências da forte propriedade de atração de eosinófilos para o local de inflamação. Alguns estudos demonstram que após a administração de RANTES metilado, que é o antagonista de RANTES, há uma redução significativa do grau de eosinofilia após desafio com alérgeno (Gonzalo, 1998). Por outro lado, RANTES também modula a expressão de citocinas, induzindo a troca de Th-2 para Th-1 (Chensue et al., 1999) e controla a regulação de citocinas Th-1 e Th-2 (Lillard, 2001).

Alguns autores sugerem que uma alternativa terapêutica para o tratamento da asma seria a neutralização de RANTES ou o bloqueio dos seus receptores, que podem diminuir o grau de eosinofilia nas vias aéreas. Porém, estas alternativas não mostraram-se capazes e eficazes de modular a hiper-responsividade de vias aéreas (Gonzalo et al., 1998; Lukacs et al., 1997).

1.3 GLICOPROTEÍNAS NA ASMA

As glicoproteínas são proteínas que contêm carboidratos ligados a elas covalentemente. Estabelecem as ligações entre os vários componentes do tecido conjuntivo, sendo, por isso, designadas por glicoproteínas adesivas, sobretudo a fibronectina, a tenascina e a laminina. Na asma, estes três tipos de glicoproteínas estão com suas deposições subepiteliais alteradas (Vignola et al., 2003). A fibronectina é uma glicoproteína de elevado peso molecular (dímero de 450 Kd), contendo cerca de 5% de carboidratos e que se liga a receptores proteicos da membrana celular chamados integrinas. Promove a adesão entre: células, outras moléculas de fibronectina e estruturas fibrosas da matriz. É, portanto, a ponte de união entre células não epiteliais, levando à migração celular e à quimiotaxia, regulando a proliferação e diferenciação celular (Hocking, 2002). Sua expressão é alta em tecidos lesados, estando diretamente implicada no reparo tecidual (Limper, Roman, 1992). Níveis exacerbados de fibronectina no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos correlacionam-se com a imunorreatividade de macrófagos alveolares (Vignola et al., 1996).

Os fibroblastos são responsáveis pela produção de uma série de componentes da matriz extracelular, entre eles, colágeno, fibras elásticas e reticulares, laminina, fibronectina, ácido hialurônico, glicoproteínas e proteoglicanos (Sheppard e Harrison 1992; Spoelstra et al., 2001). Mudanças no comportamento de fibroblastos promovem uma desregulação da matriz extracelular, levando então a um processo de remodelamento.

A formação da matriz de fibronectina é um processo dinâmico e célula dependente, altamente regulado pelos fibroblastos. A perda dessa regulação,

promove, tanto aumento da deposição de fibronectina, bem como de outras moléculas na matriz subepitelial de pacientes asmáticos (Vignola et al., 2003). Um sítio específico na fibronectina modula a contratilidade da célula e a migração celular. Além disso, o aumento da exposição deste sítio pode levar a remodelamento de tecido, alterando não só a contratilidade celular, mas também a reepitelização do tecido. Hocking (2002), sugere que controlar a extensão e a duração deste processo de exposição dos sítios da fibronectina, seria uma estratégia funcional para tratar o remodelamento na asma.

O cisteinil leucotrieno LTD4 promove uma potencialização da fibronectina induzida através da migração de fibroblastos no pulmão de humanos (Kato et al., 2005), contribuindo assim para o processo de remodelamento.

1.4 FATORES DE CRESCIMENTO

Fatores de crescimento desempenham um papel importante durante o processo de remodelamento pulmonar na asma. Aumento da expressão de TGF- β (Khalil et al., 1991) e PDGF (Martinet et al., 1997) foi encontrado em fibrose pulmonar (altamente relacionada com a asma pelo fato da desregulação da matriz extracelular), possuindo papel fundamental na deposição excessiva de matriz extracelular e também na proliferação de células. TGF- β promove a proliferação de fibroblastos (Hill et al., 1986) e IGF-I é um potente mitógeno para fibroblastos e células musculares lisas (Clemmons et al., 1985).

O TGF- β (fator transformador de crescimento-beta), citocina imunorreguladora, parece antagonizar os efeitos da IL-5 nos eosinófilos além de inibir a desgranulação

eosinofílica e a produção de citocinas, porém esses efeitos inibitórios ainda não são totalmente conhecidos (Alam et al., 1994). Para inibir a apoptose de eosinófilos pode-se ativar basicamente dois mecanismos: o aumento da expressão dos fatores de aumento de sobrevivência e/ou a diminuição dos fatores de "morte celular" (Simon e Alam, 1999).

TGF- β é potente ativador dos fibroblastos por estimular sua proliferação e aumentar a expressão gênica de diversas proteínas matriciais, sendo crítico para o aumento na formação/deposição da MEC (Roberts, 2002). Regula o aumento da expressão de pró-colágeno tipo I, efeito que é acompanhado do incremento na síntese de biglicam e versicam, dois proteoglicanos de matriz que contêm condroitim sulfato (Kinsella et al., 2004).

O fator de crescimento insulínico-I (IGF-I) exerce suas funções através da ligação com proteínas específicas, dessa forma, Veraldi et al. (2009) observaram que os níveis da proteína ligante do fator de crescimento insulínico (IGFBP)-3 encontravam-se elevados no BAL de pacientes asmáticos após 48 horas de desafio com antígeno, sugerindo que a proteína 3 talvez seja o principal sítio de ligação do IGF-I para o desenvolvimento do quadro de remodelamento pulmonar na asma.

O fator de crescimento insulínico-I (IGF-I) também apresenta expressão pulmonar aumentada em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica e seus efeitos estão ligados à inflamação de vias aéreas e remodelamento, mas os efeitos dos anti-leucotrienos e dos inibidores de óxido nítrico nestes modelos permanecem obscuros (GINA, 2008).

A obstrução da luz brônquica pode ser resultado de repetida estimulação da musculatura lisa brônquica por agonistas contráteis, citocinas, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento (*platelet-derived growth factor* (PDGF),

epidermal growth factor (EGF) e *insulin-like growth factor* (IGF) liberados durante o processo inflamatório crônico (Chung, 2000).

1.5 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

1.5.1 ANTI-LEUCOTRIENOS

Como já citamos anteriormente, os leucotrienos parecem ser os principais mediadores responsáveis pelas alterações encontradas na resposta asmática imediata (Holgate e Finnerty, 1988; Harris et al., 1995). Por este motivo, foram desenvolvidos estudos que possibilitassem a identificação de substâncias capazes de inibir a ação ou a síntese dos leucotrienos.

São duas as classes de agentes farmacológicos: os antagonistas competitivos de receptores de leucotrienos e os inibidores da síntese de leucotrienos. Montelukaste sódico, também conhecido como MK-0476 é um medicamento oral, potente, competitivo e seletivo antagonista do receptor de leucotrieno D4 (LTD4) e foi utilizado neste trabalho.

Vidal et al. (2001) realizaram um estudo duplo cego e randomizado comparando os efeitos do montelukaste e da budesonida, nos pacientes com broncoconstrição induzida por exercício, que possuíam sinais clínicos há pelo menos 1 ano e com queda de, pelo menos 20% do VEF1 (volume expiratório forçado no 1º segundo) após exercício. Estes pacientes receberam um dos tratamentos por 15 dias e, não só o montelukaste, como também a budesonida foram responsáveis por uma redução significativa da queda do VEF1, após exercício, quando comparada à condição basal (período de 15 dias sem nenhuma terapia). Todavia, houve variações individuais significativas na resposta aos tratamentos. Os autores sugeriram que, tanto o montelukaste quanto a budesonida,

podem prevenir a broncoconstrição induzida por exercício, porém os fármacos devem ser testados em cada paciente antes de se optar por uma terapia de longa duração.

Minoguchi et al. (2002) realizaram um estudo em pacientes asmáticos portadores de asma leve a moderada. Através dessa pesquisa, concluíram que a porcentagem de eosinófilos tanto no sangue periférico quanto no escarro, foi reduzida de uma forma bastante significativa nos pacientes que receberam o tratamento com montelucaste, quando comparados aos controles. Porém, não foram observadas melhoras nos sintomas da asma e também na responsividade à histamina.

Leick-Maldonado et al. (2004) avaliaram os efeitos do montelucaste em cobaias com inflamação alérgica crônica pulmonar e verificaram que após o tratamento com o medicamento, o número de eosinófilos diminuiu nas vias aéreas.

Em 2010, Rabinovitch et al. analisaram se a relação entre a excreção urinária de 318 crianças com asma leve a moderada de leucotrieno E4 (LTE4) e a fração óxido nítrico exalado (FENO) destas crianças associava-se com a capacidade de resposta preferencial ao montelucaste, quando comparado com o tratamento com propionato de fluticasona (FP). Os autores concluíram que a razão entre leucotrienos e a fração de óxido nítrico exalado foi capaz de prever uma melhor resposta ao montelucaste do que o tratamento com fluticasona nos pacientes portadores de asma leve a moderada.

Estudos de eficácia terapêutica demonstram que os antileucotrienos são mais eficazes do que o tratamento com placebo. Porém, quando comparados aos glicocorticoides inalatórios não existem evidências significativas em relação à superioridade desta forma de tratamento para a asma. Observa-se que há diminuição no número de exacerbações e no decréscimo da contagem de eosinófilos no sangue, em pacientes que receberam montelucaste sódico como tratamento (Stelmach et al., 2002).

Joos et al. (2008) demonstraram que o montelucaste, na forma de terapia adicional ao corticosteroide inalatório, é capaz de controlar de maneira mais significativa pacientes com asma leve e moderada, quando comparado com a monoterapia com corticosteroide inalatório. Embora a adição de salmeterol ao corticosteroide inalatório seja clinicamente tão eficaz quanto ou até mais eficaz do que a adição de montelucaste, este último confere maior segurança em uso prolongado, oferecendo uma terapia alternativa para estes pacientes.

De forma geral, na ausência de conhecimento da resposta individual de um paciente ao tratamento com quaisquer das terapias, os dados favorecem iniciar o tratamento com glicocorticoide inalatório (GINA, 2010). Porém, para pacientes com asma leve, há um número de circunstâncias que justificam a opção por antileucotrienos. Como exemplos, podemos citar pacientes com sintomas induzidos predominantemente por exercícios, dificuldades para a utilização dos dispositivos inalatórios ou eventualmente por terem apresentado efeitos adversos dos glicocorticóides inalatórios, tais quais disfonia e candidíase oral e também pacientes que possuem intolerância à aspirina (GINA, 2010).

1.5.2 CORTICOSTEROIDES

Os corticosteroides entram nas células dos tecidos-alvo e dessa maneira, conseguem interagir com proteínas receptoras citoplasmáticas específicas para glicocorticoides ou mineralocorticoides, alterando a conformação destes receptores, que até então encontram-se inativos. O receptor de glicocorticoides (GR) inativo forma um

complexo com outras proteínas, que podem facilitar a mudança do GR para uma conformação apropriada, essencial para a fixação do ligante (Schimmer e Parker, 1996).

Após essa ligação que ativa os GR, as proteínas associadas passam por um processo de dissociação, fazendo com que o GR transloque-se para o núcleo. Sob ativação, o GR forma um dímero, ligando-se ao DNA em regiões específicas que reconhecem e fixam o GR ativado. Esta interação é capaz de alterar as taxas de transcrição, resultando assim em indução ou repressão gênica, propiciando especificidade para a transcrição do gene responsivo aos glicocorticoides (Schimmer e Parker, 1996).

O GR ativado pode ligar-se diretamente a outros fatores de transcrição ativados numa interação proteína-proteína, evitando a interação do GR com o DNA. Esta etapa pode ser determinante na responsividade ao esteroide e um mecanismo fundamental pelo qual os glicocorticoides exercem suas ações anti-inflamatórias (Barnes e Adcock, 1993).

Os glicocorticoides por via sistêmica são prescritos há muito tempo no tratamento da asma crônica e também para exacerbações agudas graves da doença (McFadden, 1993). Sua administração sob a forma inalatória melhorou a segurança do tratamento (Cengizlier et al., 2000; Manning et al., 2008). Os glicocorticoides são importantes na modificação de vários aspectos do complexo conjunto de respostas inflamatórias na asma. Atualmente são considerados como a principal terapia para controle da asma persistente leve, moderada e grave (GINA, 2010; IV Consenso Brasileiro para o Manejo da Asma - SBPT, 2006).

A asma leve e moderada pode ser controlada com baixas doses de esteroides inalados com ou sem broncodilatadores. Porém, 5% a 10% dos pacientes apresentam mais exacerbações da doença apesar da medicação. Pesquisas recentes demonstraram

que o estresse oxidativo pode contribuir para o remodelamento, o que é associado a um componente de refratariedade da asma. Todavia, esta mesma pesquisa não demonstrou relatos de que o estresse oxidativo está envolvido na asma refratária, o que conclui que pacientes com asma refratária têm mais estresse oxidativo em suas vias aéreas quando comparados a pacientes com asma controlada (Sugiura et al., 2008).

Xu et al. (2000), utilizando modelo experimental de resposta pulmonar aguda em ratos Brown-Norway demonstraram que o tratamento com budesonida (glicocorticoide inalatório) reduziu a produção de leucotrienos cisteínicos na fase tardia da resposta ao antígeno, assim como houve atenuação no número total de células inflamatórias presentes no lavado broncoalveolar, às custas de uma redução na quantidade de macrófagos. Sendo assim, os autores sugeriram que parte do efeito do tratamento com budesonida possa ser devido ao bloqueio na produção de leucotrienos nos macrófagos alveolares.

1.5.2.1 NF- κ B

Fatores de transcrição, como o NF- κ B também interagem com o GR, sendo ativados através de sinais inflamatórios (Barnes, 1998).

Nos últimos 20 anos, o NF- κ B ganhou destaque no processo inflamatório alérgico e muitos estudos, tendo como foco esta molécula, começaram a surgir. Por ser considerado fator de transcrição expresso em vários tipos celulares, estando envolvido na síntese de citocinas, moléculas de adesão, quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento, é possível dizer que este fator de transcrição possui papel central na inflamação (Baldwin, 2001). A ativação dos fatores de transcrição envolve

muitos mecanismos, sendo considerada um processo extremamente complexo e que envolve várias vias de transdução de sinais intracelulares, incluindo quinases [como mitogen-activated protein kinases (MAPKs), Janus kinases (JAKs) e proteinoquinase C (PKC)], que são estimuladas por receptores localizados na superfície celular (Karin, 1998).

Através de uma maneira direta ou por ligantes, os fatores de transcrição também podem ser ativados (por ex. corticoides). Dentro do citoplasma também ocorre ativação, com exposição dos sinais de localização nuclear, aonde os fatores de transcrição translocam-se para o núcleo (Adocck, 2001). Moléculas de NF- κ B existem no citoplasma da maioria das células sem estarem ligadas ao DNA, ou seja, na sua forma inerte. O NF- κ B é retido no citosol por moléculas inibidoras conhecidas como, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e I κ B γ . É importante ressaltar que existem várias proteínas NF- κ B diferentes, sendo a forma clássica um heterodímero, uma proteína (p65) de 65-kDa (Rel A) e uma subunidade (p50) de 50-kDa (Rel B). A ativação extracelular por diversos fatores como luz ultravioleta, vírus, agentes oxidantes e citocinas pró-inflamatórias pode determinar a ativação da I κ B quinase. A ativação do NF- κ B se dá predominantemente por fosforilação e degradação das proteínas I κ B. Após a fosforilação dessas proteínas, o NF- κ B livre transloca-se para o núcleo, onde faz um “upregulate” da expressão de múltiplos genes envolvidos nas respostas inflamatórias e imune, incluindo moléculas de adesão como a ICAM-1 e VCAM-1, enzimas como a COX-2 e a iNOS e a maior parte das citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6, GM-CSF além de quimocinas como RANTES e eotaxina (Tergaonkar, 2006). O NF- κ B é também considerado fundamental na ativação de células T, estando envolvido na “upregulation” da IL-2 bem como de seus receptores (Lenardo e

Baltimore, 1989). Nas células epiteliais, este fator de transcrição pode atuar ampliando a inflamação em várias doenças inflamatórias, inclusive na asma (Barnes e Adcock, 1997). No núcleo, o NF- κ B liga-se ao DNA nos promotores de genes alvos como um dímero composto por dois membros da família de proteínas Rel, o Rel A e o Rel B. No heterodímero NF- κ B, as duas subunidades entram em contato direto com o DNA, todavia, apenas Rel A possui o domínio de transativação, ativando a transcrição por interação direta com a maquinaria basal de transcrição. Na subunidade Rel B falta este domínio de transativação (Schmitz e Baeuerle, 1991).

2. OBJETIVOS

Deste modo, nossos objetivos neste trabalho foram:

- Avaliar os efeitos dos tratamentos com montelucaste e dexametasona, através da comparação de eficácia desses medicamentos nos seguintes parâmetros analisados:

- Ativação eosinofílica

- Quimiocinas (RANTES e eotaxina)

- Fator de crescimento insulínico (IGF-I)

- Glicoproteínas (Fibronectina)

- Fator de transcrição (NF- κ B)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos e executados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq número 0276/09). Foram utilizadas 38 cobaias Hartley do sexo masculino, tendo ocorrido seis perdas de animais durante os experimentos. Os animais apresentavam peso entre 250g e 300g ao início do protocolo e foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Investigação Médica 20 (LIM-20), desta Faculdade, recebendo alimento e água *ad libitum*, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído, conforme recomendado no “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985).

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais receberam:

- a) Inalações com soro fisiológico 0,9% estéril (grupo SAL, n=8);
- b) Inalações com ovoalbumina (grupo OVA, n=8);
- c) Inalações com ovoalbumina e tratamento com dexametasona (grupo OVAD, n=8);
- d) Inalações com ovoalbumina e tratamento com montelucaste (grupo OVAM, n=8);

3.2 PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

A sensibilização dos animais, por indução de inflamação pulmonar alérgica crônica, foi realizada conforme já descrito anteriormente (Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2005; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Ruiz-Schütz et al., 2009; Marques et al., 2012; Leick et al., 2012). As cobaias foram colocadas em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (Soniclear, São Paulo, Brasil). Foram submetidas à inalação com aerossol de ovoalbumina (Sigma Chemical, St. Louis, MO), diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) por 15 minutos ou até o aparecimento de sinais de desconforto respiratório, tais como chiado, espirros, coriza, tosse e/ou tiragem intercostal. Era esperado que esse desconforto respiratório só ocorresse após a quarta inalação com 1 mg/mL de solução de ovoalbumina, quando, então, o animal já estaria sensibilizado. O observador que decidiu pela retirada das cobaias da caixa de inalação não estava ciente do tratamento ao qual as mesmas estavam sendo submetidas.

O protocolo de inalação foi repetido duas vezes por semana durante um período de quatro semanas, totalizando sete inalações. A concentração de ovoalbumina foi sendo aumentada ao longo do protocolo (1~5 mg/mL) para evitar tolerância oral. Nas duas primeiras semanas (inalações 1-4), as cobaias receberam uma solução com 1 mg/mL de ovoalbumina. Na terceira semana (5ª e 6ª inalações), a dose utilizada foi de 2,5 mg/mL de ovoalbumina. Na quarta semana (= 7ª inalação), a dose foi aumentada para 5 mg/mL de ovoalbumina.

Figura 4. Os animais controle foram submetidos à exposição de aerossol de solução de soro fisiológico seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

3.2.1 Tratamento com corticosteroide

Vinte e quatro horas após a quarta inalação com ovoalbumina foi iniciado o tratamento diário de um grupo de cobaias (grupo OVAD) com dexametasona (2mg/kg/dia i.p.), durante as duas semanas seguintes de inalação com ovoalbumina. Nos dias de inalação com ovoalbumina, as cobaias receberam o tratamento cinco horas antes da exposição ao antígeno (Seco et al., 1998, Leick-Maldonado et al., 2004).

3.2.2 Tratamento com montelucaste sódico

Vinte e quatro horas após a quarta inalação com ovoalbumina um grupo de cobaias (grupo OVAM) recebeu diariamente o antagonista de receptor de leucotrienos montelucaste sódico (10mg/kg, ressuspendido em salina 0,9%, PO) (Merck Sharp &Dohme). Nos dias de inalação com ovoalbumina, as cobaias receberam montelucaste sódico, quatro horas antes da exposição ao antígeno.

Protocolo de sensibilização

Figura 5. Esquema do protocolo de sensibilização. As cobaias eram inaladas, duas vezes por semana, uma a uma, com doses crescentes de ovoalbumina ou soro fisiológico (NaCl 0,9%). Ao todo eram realizadas sete inalações, sendo que a última era realizada 72 horas antes da avaliação da mecânica pulmonar, durante a qual os animais eram broncoprovocados com ovoalbumina, em uma concentração de 30 mg.mL^{-1} ou com soro fisiológico.

3.3 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Após quatro semanas todos os animais foram anestesiados, traqueostomizados, ligados a um ventilador para pequenos animais, exsanguinados, os pulmões retirados na capacidade funcional residual, fixados em formaldeído a 10%, em quantidade suficiente para imersão total do pulmão por 24 horas. Após este período, foram então transferidos

para uma solução de etanol 70%. Depois de terminada a fixação, cortes paralelos ao eixo bronco-vascular, representando áreas periféricas dos pulmões foram processados para rotina histológica habitual com parafina, para obtenção de cortes de 4µm de espessura.

Para o estudo morfométrico foi utilizado um microscópio óptico comum (CH30, Olympus), com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos acoplado à ocular do microscópio, utilizando-se a técnica de contagem de pontos (Gundersen et al., 1988).

O retículo foi colocado adjacente à parede da via aérea, a partir da base do epitélio (foram selecionadas vias aéreas não-cartilaginosas seccionadas transversalmente) ou sobre o parênquima pulmonar distal.

Foram analisadas três vias aéreas por pulmão em aumento de 1000x e 10 campos no tecido pulmonar periférico. O número de células positivas para as colorações de imunohistoquímica foi determinado como o número de células positivas em cada campo dividido pelo número de pontos na área de parede da via aérea ($10^4\mu\text{m}^2$). A quantificação do número de células positivas no tecido pulmonar periférico foi feita pela razão entre o número de pontos que incidiam nas células positivas em uma determinada área e o número de pontos total que coincidia com a área de septo alveolar, no aumento de 1000x. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

Foram realizadas as seguintes colorações:

3.3.1 Quantificação de Eosinófilos

As fatias de tecido pulmonar de 5µm foram fixadas com LUNA para avaliação de eosinófilos (Luna, 1986; Watanabe et al., 2004). A porcentagem de eosinófilos no tecido pulmonar periférico e também nas vias aéreas foi obtida por estudo morfométrico, com o

auxílio de um retículo de área conhecida (50 retas e 100 pontos), acoplado a um microscópio óptico (CH30, Olympus, Japão).

A quantificação do número de células positivas no tecido pulmonar periférico foi feita pela razão entre o número de pontos que incidiam nas células positivas em uma determinada área e o número de pontos total que coincidia com a área de septo alveolar, no aumento de 1000x. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$). A contagem foi realizada em 10 campos no tecido pulmonar periférico, por corte (animal), selecionados de forma randômica. Três vias aéreas selecionadas aleatoriamente de cada fragmento pulmonar também foram analisadas com aumento de 1000x. O número de eosinófilos foi determinado como o número de células positivas dentro do retículo dividido pelo número de pontos coincidindo com a área de tecido ao redor da parede da via aérea ($10^4\mu\text{m}^2$). Vários autores já demonstraram previamente que este método é adequado e reprodutível (Garcia et al., 1994; Warth et al., 1995, Tibério et al., 1997; Tibério et al., 2003; Leick-Maldonado et al., 2004).

3.3.2 Avaliação de células positivas para eotaxina

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo eotaxina foi utilizado o método peroxidase. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela de Pressão Pascal por 1 min a 125° , com tampão citrato pH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário eotaxina-1 (Santa Cruz, Sc 6181, EUA), título 1:100, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes

para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1 hora) e complexo (30 minutos) pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) em estufa a 37°. Ao fim desta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Para finalizar a imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.3.3 Avaliação de células positivas para RANTES

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo RANTES foi utilizado o método peroxidase. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H₂O₂ 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor por 30 min a 95°, logo após, houve um período de resfriamento de 20 minutos, com tampão citrato pH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário RANTES (Santa Cruz, Sc 1410, EUA), título 1:400, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1 hora) e complexo (30 minutos) pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) em estufa a 37°. Ao fim desta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Para finalizar a

imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.3.4 Avaliação de células positivas para IGF-I

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo IGF-I foi utilizado o método peroxidase. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela de Pressão Pascal por 1 min a 125° , com tampão citratopH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário IGF-I (Santa Cruz, Sc 9013, EUA), título 1:75, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo pós primário (30 minutos) e polímero (30 minutos) pelo kit Novolink (Max Polymer, Leica, UK) em estufa a 37° . Ao fim desta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Para finalizar a imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.3.5 Avaliação de células positivas para fibronectina

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo fibronectina foi utilizado o método peroxidase. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela de Pressão Pascal por 1 min a 125°, com tampão citrato pH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário fibronectina (DAKO 0245, Dinamarca), título 1:400, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo pós primário (30 minutos) e polímero (30 minutos) pelo kit Novolink (Max Polymer, Leica, UK) em estufa a 37°. Ao fim desta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação com 3,3 DAB (Sigma Chemical, St Louis, EUA). Para finalizar a imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.3.6 Avaliação de células positivas para NF- κ B

Para o estudo imunohistoquímico para o anticorpo NF- κ B foi utilizado o método peroxidase. As lâminas previamente silanizadas foram desparafinadas e hidratadas e procedeu-se com o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com água oxigenada H_2O_2 10V 3% por 7 vezes de 5 minutos cada, seguido de lavagem com água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada em panela de Pressão Pascal por 1 min a 125°, com tampão citrato pH 6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário NF- κ B (Santa

Cruz, SC 109 EUA), título 1:50, foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes para incubação por uma noite. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1 hora) e complexo (30 minutos) pelo kit ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) em estufa a 37°C. Para finalizar a imunohistoquímica as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por intermédio do programa *SigmaStat* (Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA). Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão (SEM) e os foram feitos gráficos de barras. Os dados foram examinados utilizando-se a Análise de Variância para um Fator (*One Way Analysis of Variance*). As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de *Holm-Sidak*. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$ (Zar, 1984).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DE EOSINÓFILOS

A *Figura 6a* representa os valores da média $\pm$ EP da densidade de eosinófilos no parênquima distal de cobaias. Houve um aumento na densidade de eosinófilos no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $9,91 \pm 0,70/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL $2,62 \pm 0,26/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve decréscimo deste conteúdo nos grupos OVAM ($3,03 \pm 0,28/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($4,17 \pm 0,36/10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Cabe ressaltar que não houve diferença entre OVAM e OVAD.

Figura 6a. Valores de média $\pm$ EP de densidade de eosinófilos no parênquima distal de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

A Figura 6b representa os valores da média $\pm$ EP da densidade de eosinófilos nas vias aéreas de cobaias. Houve um aumento na densidade de eosinófilos no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $17,72 \pm 3,79/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL $4,89 \pm 0,97/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve decréscimo deste conteúdo nos grupos OVAM ($11,55 \pm 0,87/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($8,05 \pm 0,67/10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Cabe ressaltar que não houve diferença entre OVAM e OVAD.

Figura 6b. Valores de média $\pm$ EP de densidade de eosinófilos nas vias aéreas de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo SAL.

4.2 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA EOTAXINA

A *Figura 7a* mostra os valores de células positivas para eotaxina no parênquima distal de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para eotaxina no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $19,38 \pm 0,79/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $3,00 \pm 0,39/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução do número de células positivas para eotaxina nos grupos OVAM ($5,65 \pm 0,38/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($9,9 \pm 0,54/10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$), porém, nos animais OVAM a redução de células positivas para eotaxina mostrou-se mais significativa em relação ao grupo OVAD ($p < 0,001$).

Figura 7a. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para eotaxina no parênquima distal de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL e OVAD. # $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

A *Figura 7b* mostra os valores de células positivas para eotaxina nas vias aéreas de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para eotaxina no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $13,23 \pm 1,18/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $6,92 \pm 0,99/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução do número de células positivas para eotaxina nos grupos OVAM ($9,29 \pm 0,86/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($7,03 \pm 0,70/10^4 \mu\text{m}^2$), comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$), porém, nos animais OVAD a redução de células positivas para eotaxina mostrou-se mais significativa em relação ao grupo OVAM ($p < 0,001$).

Figura 7b. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para eotaxina nas vias aéreas de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos.

4.3 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS RANTES

A *Figura 8a* mostra os valores de células positivas para RANTES no parênquima distal de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para RANTES no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA $19,84 \pm 1,25/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL $2,40 \pm 0,35/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução do número de células positivas para RANTES nos grupos OVAM ($6,44 \pm 0,66/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($5,47 \pm 0,54/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos OVAM e OVAD.

Figura 8a. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para RANTES no parênquima distal de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

A *Figura 8b* mostra os valores de células positivas para RANTES nas vias aéreas de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para RANTES no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA $27,56 \pm 1,83/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL $18,88 \pm 1,31/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve redução do número de células positivas para RANTES nos grupos OVAM ($18,14 \pm 1,30/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($20,05 \pm 1,24/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos OVAM e OVAD.

Figura 8b. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para RANTES nas vias aéreas de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos.

4.4 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA IGF-I

A Figura 9a mostra os valores de células positivas para IGF-I no parênquima distal de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para IGF-I no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $22,89 \pm 1,16/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $4,87 \pm 0,93/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para IGF-I nos grupos OVAM ($11,83 \pm 0,51/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($6,21 \pm 0,56/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$), porém, nos animais OVAD a redução de células positivas para IGF-I mostrou-se mais significativa em relação ao grupo OVAM ($p < 0,001$).

Figura 9a. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para IGF-I no parênquima distal de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL e OVAD.

A Figura 9b mostra os valores de células positivas para IGF-I nas vias aéreas de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para IGF-I no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $50,70 \pm 1,43/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $25,70 \pm 1,79/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para IGF-I nos grupos OVAM ($25,53 \pm 1,36/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($20,90 \pm 4,35/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos OVAM e OVAD.

Figura 9b. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para IGF-I nas vias aéreas de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos.

4.5 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA FIBRONECTINA

A *Figura 10a* mostra os valores de células positivas para fibronectina no parênquima distal de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para fibronectina no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $25,25 \pm 0,90/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $8,61 \pm 0,70/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para fibronectina nos grupos OVAM ($13,41 \pm 0,47/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($14,61 \pm 0,82/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos OVAM e OVAD.

Figura 10a. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para fibronectina no parênquima distal de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,001$ comparado ao grupo SAL.

A *Figura 10b* mostra os valores de células positivas para fibronectina nas vias aéreas de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para fibronectina no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $33,69 \pm 1,66/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $10,35 \pm 5,98/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para fibronectina nos grupos OVAM ($5,21 \pm 2,47/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($10,88 \pm 3,33/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos OVAM e OVAD.

Figura 10b. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para fibronectina nas vias aéreas de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos.

4.6 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA NF-κB

A *Figura 11a* mostra os valores de células positivas para NF-κB no parênquima distal de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para NF-κB no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos: OVA: $31,38 \pm 5,21/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $5,38 \pm 0,79/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Houve redução no número de células positivas para NF-κB nos grupos OVAM ($11,04 \pm 0,86/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($8,06 \pm 0,70/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,001$). Cabe ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos OVAM e OVAD.

Figura 11a. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para NF-κB no parênquima distal de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,001$ comparado aos demais grupos.

A Figura 11b mostra os valores de células positivas para NF- κ B nas vias aéreas de cobaias. Houve um aumento no número de células positivas para NF- κ B no grupo sensibilizado comparativamente ao seu controle (grupos OVA: $26,20 \pm 1,34/10^4 \mu\text{m}^2$, SAL: $11,95 \pm 0,96/10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve redução no número de células positivas para NF- κ B nos grupos OVAM ($12,84 \pm 1,09/10^4 \mu\text{m}^2$) e OVAD ($8,95 \pm 0,78/10^4 \mu\text{m}^2$) comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$), porém, nos animais OVAD a redução de células positivas para NF- κ B mostrou-se mais significativa em relação ao grupo OVAM ($p < 0,05$).

Figura 11b. Valores de média $\pm$ EP de células positivas para NF- κ B nas vias aéreas de cobaias expostas a inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratadas com montelucaste sódico ou dexametasona. * $P < 0,05$ comparado aos demais grupos; ** $P < 0,05$ comparado ao grupo OVAD.

4.7 ANÁLISE DESCRITIVA DOS FRAGMENTOS DE PULMÃO

A *Figura 12* mostra fotomicrografias representativas de vias aéreas de cobaias que receberam inalação com solução salina, (grupo SAL) (figuras A, E, I, M e Q), cobaias que receberam inalação com ovoalbumina, (grupo OVA) (figuras B, F, J, N, R e V), cobaias que foram tratadas com montelucaste, (grupo OVA-M) (figuras C, G, K, O, S e W) e cobaias que foram tratadas com dexametasona, (grupo OVA-D) (figuras D, H, L, P, T e X). Foram feitas as colorações de LUNA (figuras A até D – x400), imunohistoquímica para eotaxina (figuras E até H – x400), imunohistoquímica para RANTES (figuras I até L – x400), imunohistoquímica para IGF-I (figuras M até P – x400), imunohistoquímica para fibronectina (figuras Q até T – x400) e imunohistoquímica para NF- κ B (figuras U até X – x400). Os grupos controle apresentam número de eosinófilos, número de células positivas para eotaxina, RANTES, IGF-I, fibronectina e NF- κ B diminuídos, enquanto que o grupo OVA apresenta número de eosinófilos elevado (B), número elevado de células positivas para eotaxina (F), RANTES (J), IGF-I (N), fibronectina (R) e NF- κ B (V). Ambos tratamentos reduziram esses parâmetros.

Figura 12. Fotomicrografias representativas de vias aéreas, coradas com LUNA (painéis A a D- x400), coradas para detectar células positivas para eotaxina (painéis E a H- x400), coradas para detectar células positivas RANTES (painéis I a L- x400), coradas para detectar células positivas para IGF-I (painéis M a P- x400), coradas para detectar células positivas para fibronectina (painéis Q a T- x400) e coradas para detectar células positivas para NF-κB (painéis U a X- x400) de cobaias que receberam inalações com salina 0,9%, SAL (painéis A a U), de cobaias que receberam inalações com ovoalbumina, OVA (painéis B a V), de cobaias que receberam inalação com ovoalbumina e tratamento com montelucaste, OVA-M (painéis C a W) e cobaias que receberam inalação com ovoalbumina e tratamento com dexametasona, OVA-D (D a X).

A *Figura 13* mostra fotomicrografias representativas de parênquima pulmonar periférico de cobaias que receberam inalação com solução salina, (grupo SAL) (figuras A, E, I, M e Q), cobaias que receberam inalação com ovoalbumina, (grupo OVA) (figuras B, F, J, N, R e V), cobaias que foram tratadas com montelucaste, (grupo OVA-M) (figuras C, G, K, O, S e W) e cobaias que foram tratadas com dexametasona, (grupo OVA-D) (figuras D, H, L, P, T e X). Foram feitas as colorações de LUNA (figuras A até D – x400), imunohistoquímica para eotaxina (figuras E até H – x400), imunohistoquímica para RANTES (figuras I até L – x400), imunohistoquímica para IGF-I (figuras M até P – x400), imunohistoquímica para fibronectina (figuras Q até T – x400) e imunohistoquímica para NF- κ B (figuras U até X – x400). Os grupos controle apresentam número de eosinófilos, número de células positivas para eotaxina, RANTES, IGF-I, fibronectina e NF- κ B diminuídos, enquanto que o grupo OVA apresenta número de eosinófilos elevado (B), número elevado de células positivas para eotaxina (F), RANTES (J), IGF-I (N), fibronectina (R) e NF- κ B (V). Ambos tratamentos reduziram esses parâmetros. Embora a análise microscópica tenha sido feita em ampliação 1000x, as fotomicrografias estão mostradas em menor ampliação para melhor destacar as diferenças entre os grupos.

Figura 13. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar periférico, corados com LUNA (painéis A a D- x400), corados para detectar células positivas para eotaxina (painéis E a H- x400), corados para detectar células positivas RANTES (painéis I a L- x400), corados para detectar células positivas para IGF-I (painéis M a P- x400), corados para detectar células positivas para fibronectina (painéis Q a T- x400) e corados para detectar células positivas para NF- κ B (painéis U a X- x400) de cobaias que receberam inalações com salina 0,9%, SAL (painéis A a U), de cobaias que receberam inalações com ovoalbumina, OVA (painéis B a V), de cobaias que receberam inalação com ovoalbumina e tratamento com montelucaste, OVA-M (painéis C a W) e cobaias que receberam inalação com ovoalbumina e tratamento com dexametasona, OVA-D (D a X).

5. *DISCUSSÃO*

O uso de glicocorticoides na asma, principalmente por via inalatória, é particularmente no controle das formas persistentes de leve a grave da doença, é amplamente abordado como sendo o tratamento mais efetivo no controle desta patologia. Porém é necessário lembrar que, embora esta classe de medicamentos seja considerada a terapia “gold standard”, há muitos pacientes que mantêm formas graves da doença e que não respondem aos tratamentos farmacológicos já conhecidos e utilizados atualmente.

Alguns autores sustentam que muitas das alterações fisiopatológicas encontradas no processo de remodelamento pulmonar parecem não ser totalmente responsivas aos corticosteroides, o que nos faz pensar em novas alternativas para o tratamento desta patologia em estudo (Ward e Walters 2005).

Henderson et al. (2006), comparando os efeitos de dexametasona e montelucaste em um modelo experimental de asma, constaram que apenas montelucaste foi capaz de controlar alguns parâmetros clássicos do remodelamento, tais como a fibrose subepitelial e alterações de células musculares lisas, sugerindo que o processo de remodelamento não consiga ser totalmente modulado pelos corticosteroides.

Entretanto, Abdel et al. (2012) avaliaram os efeitos de beclometasona (outro tipo de corticosteroide) e montelucaste no remodelamento de vias aéreas em murinos. Constataram que a administração desses 2 medicamentos antes do desafio com ovoalbumina nestes animais, foi capaz de reduzir alguns parâmetros do remodelamento pulmonar, concluindo que a inalação de beclometasona e administração de montelucaste possuem papel similar no remodelamento de vias aéreas, mas que os efeitos da beclometasona na regulação de alterações

inflamatórias da asma é menos pronunciado quando este medicamento é comparado ao montelucaste.

Em pacientes asmáticos leves, o tratamento com anti-leucotrienos é uma opção considerável. Além disso, os anti-leucotrienos são a opção de escolha para tratar pacientes com intolerância à aspirina, asma em crianças, pacientes que possuem asma induzida por exercício e aqueles que possuem efeitos adversos decorrentes do uso prolongado de corticosteroides ou que possuem dificuldades para a utilização de dispositivos inalatórios (Smith, 2001).

Knorr et al. (2001) estudaram a utilização do montelucaste em crianças com asma persistente de 2 a 5 anos, e que possuíam dificuldades para utilizar os dispositivos inalatórios de corticosteroides. Após 12 semanas de tratamento, concluíram que o montelucaste foi eficaz em reduzir os sintomas da doença, tais como dispneia, tiragem intercostal, sibilos e a tosse noturna. Além disso, houve a redução de eosinófilos no sangue periférico. Neste estudo foi ressaltado o fato de que o montelucaste também possui uma maior segurança terapêutica em relação aos corticosteroides, sendo bem tolerado pelos pacientes, com via de administração prática e sem muitos efeitos adversos consideráveis.

Os leucotrienos cisteínicos parecem possuir um papel fundamental quando falamos em resposta imediata na asma, e sendo assim, são considerados os principais mediadores inflamatórios deste tipo de resposta, justificando a ação de anti-leucotrienos no controle da asma induzida por exercício e asma sensível à aspirina, por exemplo. Porém, a presença de leucotrienos cisteínicos não está restrita somente à resposta imediata, sendo estes mediadores, encontrados também na resposta tardia da asma (Smith, 2001; Bradding et al., 2006).

Antigamente, quando pensava-se em asma, acreditava-se que a inflamação crônica presente era restrita somente às vias aéreas, hoje porém, sabemos que o parênquima pulmonar possui uma importância fundamental no que diz respeito a essa inflamação e constitui um ponto importante na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na asma.

Dolhnikoff et al. (2009) sugeriram que as principais alterações do remodelamento pulmonar ocorrem principalmente nas pequenas vias aéreas e há uma problemática muito grande em relação à dificuldade dos corticosteroides em atingirem estas pequenas vias aéreas (Balzar, 2005).

Em relação ao parênquima pulmonar, Lanças et al. (2006) utilizando um modelo de inflamação pulmonar em cobaias e analisando o strip pulmonar de cobaias sensibilizadas com ovoalbumina, demonstraram aumento dos eosinófilos, tanto na fase inicial como na fase tardia da asma, além de verificarem aumento de resistência e elastância nas 2 fases da doença. Os resultados encontrados sugerem que o parênquima pulmonar está envolvido na resposta tardia e que a resposta constritora nesta fase pode estar relacionada à inflamação eosinofílica. Além disso, o comportamento mecânico do tecido pulmonar na fase tardia pode estar relacionado ao remodelamento da matriz extracelular, devido ao aumento no conteúdo de colágeno.

Atualmente, poucos estudos tendo o parênquima pulmonar como foco, têm-se dedicado a avaliar os efeitos dos tratamentos farmacológicos já existentes nas alterações encontradas no tecido pulmonar periférico (parênquima pulmonar), que como dito anteriormente, são de fundamental importância para o conhecimento fisiopatológico da doença e também para o controle de pacientes asmáticos,

principalmente aqueles com quadros graves e de difícil controle (Fonseca et al., 2006; GINA 2010; Naura et al., 2010).

É importante ressaltar que consideramos fundamental para um melhor entendimento do mecanismo fisiopatológico da doença, avaliar a asma de uma forma não fragmentada e restrita e o principal diferencial deste estudo está em avaliar os 2 compartimentos envolvidos na resposta inflamatória asmática, o parênquima pulmonar e as vias aéreas. O presente estudo, esclarece que o tratamento isolado com estes medicamentos foi capaz de controlar não só as alterações inflamatórias de vias aéreas, mas também aquelas encontradas no parênquima pulmonar, sendo de total importância para a comunidade científica.

Cabe ressaltar que neste estudo, as drogas administradas não foram por via inalatória, e sim, sistêmica, o que pode ter contribuído para a efetividade da resposta no parênquima pulmonar.

Existem vários modelos animais que podem servir como modelo experimental para o estudo da asma brônquica (cães, ratos, ovelhas, macacos e cobaias) (Wanner et al., 1990). Os que utilizam cobaias parecem ser mais vantajosos, pois esses animais são de pequeno porte e práticos para o manuseio. Além disso, as cobaias também exibem hiperresponsividade de vias aéreas a diversos estímulos e geram infiltrado eosinofílico após sua sensibilização (Ishida et al., 1989; Tibério et al., 1997; Leick-Maldonado et al., 2004).

Existem diversas maneiras de sensibilização de cobaias a antígenos, neste estudo optou-se pela forma inalada por ser aquela que simula melhor o mecanismo fisiopatológico através do qual os seres humanos desenvolvem a asma brônquica.

Tibério et al. (1997) analisaram os efeitos das repetidas exposições a aerossóis de ovoalbumina (duas vezes por semana, totalizando 4 semanas) na

gênese da inflamação de vias aéreas em cobaias. Os valores de porcentagem máxima obtidos, tanto da elastância quanto da resistência do sistema respiratório, posteriormente ao desafio com antígeno, foram significativamente maiores nas cobaias submetidas a exposições repetidas à ovoalbumina do que nos animais que foram inalados com solução salina. Notaram que houve a formação de intenso edema peribrônquico, aumento no número de eosinófilos e linfócitos nas vias aéreas e também no lavado broncoalveolar das cobaias tratadas com ovoalbumina. A avaliação imunohistoquímica mostrou que grande parte das células mononucleares presentes na parede das vias aéreas eram linfócitos T CD3/CD4+.

Nos seres humanos, logo após o contato com antígenos inalados, há o desencadeamento de duas reações, conhecidas como imediata e tardia. Hutson et al. (1988) mostraram que essas reações também ocorrem nas cobaias sensibilizadas.

Tendo sido discutido os aspectos gerais deste trabalho, passaremos agora a evidenciar cada um dos principais aspectos específicos analisados neste estudo: recrutamento eosinofílico, quimiocinas (eotaxina e RANTES), glicoproteína da matriz extracelular (fibronectina), fator de crescimento insulínico (IGF-I) e fator de transcrição (NF- κ B) relacionando a importância dos tratamentos isolados nestes mediadores e seu impacto na fisiopatologia da asma.

Em relação ao recrutamento eosinofílico, pudemos observar através dos nossos experimentos que os animais que receberam OVA tiveram um aumento bastante significativo do número de eosinófilos tanto no parênquima pulmonar distal, quanto nas vias aéreas em relação aos controles. Os dois tratamentos do protocolo, montelucaste e dexametasona, foram capazes de reduzir a inflamação eosinofílica.

Vários estudos em pacientes asmáticos foram capazes de detectar uma diminuição no número de eosinófilos após o tratamento com corticosteroides (GINA,2010).

Blain, Sirois (2000), observaram que em camundongos sensibilizados e desafiados houve uma redução dose-dependente em eosinófilos recuperados no lavado broncoalveolar tanto pelo uso da dexametasona quanto pelo uso do MK-571 (antagonista do receptor de leucotrienos).

Leick-Maldonado et al. (2004) notaram que, em cobaias sensibilizadas à ovoalbumina e tratadas com montelucaste, houve uma redução significativa do número de eosinófilos nas vias aéreas destas cobaias.

Lanças et al. (2006), utilizando cobaias, demonstraram que houve um aumento na densidade eosinofílica alveolar em respostas precoces e tardias. Nakashima et al. (2008), seguindo o mesmo modelo animal, observaram que a tolerância oral reduziu o recrutamento de eosinófilos no tecido pulmonar distal.

Henderson et al. (2002) demonstraram que camundongos tratados com ovoalbumina e que possuíam inflamação crônica de vias aéreas, desenvolveram um considerável infiltrado eosinofílico e mononuclear no interstício pulmonar, e que houve uma redução significativa no número de eosinófilos nestes camundongos após o tratamento com montelucaste sódico.

Wu et al. (2003) mostraram que o montelucaste sódico foi capaz de reduzir em 90% a quantidade de eosinófilos no BAL em ratos que foram expostos à ovoalbumina.

De Kluijver et al. (2005), expuseram pacientes com asma leve a sucessivas exposições com baixas doses de alérgeno e concomitante uso de corticosteroide

inalatório. Observaram que a utilização do medicamento foi capaz de reduzir o número de eosinófilos, bem como de neutrófilos e linfócitos T na mucosa.

Sendo assim, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura e reforçam a ideia de que a redução do número de eosinófilos em um processo inflamatório alérgico, como o que ocorre na asma, é fundamental para uma melhora significativa de muitos dos sintomas relatados pelos pacientes portadores desta doença.

Não há dúvidas de que as quimiocinas contribuem muito com o processo de eosinofilia (Pope et al., 2001). Como já ressaltado anteriormente, os eosinófilos são células que predominam e desempenham importante papel no processo inflamatório na asma e são guiados até o local de inflamação por substâncias quimiotáticas como RANTES e eotaxina (Teran, 2000).

Crapster-Pregnont et al. (2012) mostraram que as células dendríticas e macrófagos alveolares atuam como mediadores da produção de IL-13 e estão envolvidos na produção de quimiocinas, principalmente a eotaxina-1.

McMillan et al. (2005) observaram que ratos que foram expostos à ovoalbumina, possuíam diminuição da hiper-responsividade de vias aéreas, bem como diminuição do infiltrado leucocitário, IL-4, IL-12 e eotaxina-1.

Os leucotrienos (CysLTs) são substâncias que estão envolvidas diretamente com o recrutamento de eosinófilos, mas que também, possuem efeitos indiretos sobre as eotaxinas. Sendo assim, Chibana et al. (2003) mostraram que a IL-13 aumenta a expressão de receptores de leucotrienos (CysLT1R), que contribui para a ocorrência de um efeito sinérgico entre LTC₄ e IL-13 nas eotaxinas produzidas pelos fibroblastos e que os tratamentos com antagonistas de CysLT1R, como o montelucaste e pranlucaste, anulam estes efeitos.

O poder quimiotático de RANTES para eosinófilos é um fator fundamental que contribui muito para a patogênese da asma. O tratamento com corticosteroides é eficaz em reduzir a produção e a liberação desta quimiocina (Profita et al., 2005).

Profita et al. (2005) estudaram os efeitos *in vitro* de glicocorticoides na liberação de IL-8, TGF- β 1 e RANTES nas células de escarro de pacientes com asma leve à moderada e verificaram que o tratamento com glicocorticoides foi capaz de inibir a liberação de todas essas substâncias analisadas.

Xiao-Yan et al. (2006) demonstraram que o tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir a liberação de RANTES nas células de escarro de pacientes com asma grave.

Soma et al. (2008) demonstraram que, a budesonida, quando administrada sozinha ou em combinação com formoterol, possui potente efeito inibidor em RANTES e IL-5 nas células mononucleares.

Existe uma diferença fundamental entre as eotaxinas e RANTES, apesar de ambas serem consideradas quimiocinas: as eotaxinas ativam especificamente eosinófilos e além disso, ligam-se apenas ao receptor CCR3, enquanto RANTES ativam, além de eosinófilos, outros tipos celulares e não possuem afinidade por um receptor específico (Terán et al., 2006).

Essa seletividade e especificidade que as eotaxinas possuem por eosinófilos e o receptor CCR3, pode ser um ponto de partida para compreendermos o porquê de o tratamento com montelucaste ter reduzido de forma mais significativa, quando comparado ao tratamento com dexametasona, o número de células positivas para eotaxinas no parênquima distal de cobaias, neste estudo. Além disso, existem evidências que sugerem que o montelucaste possui atividade anti-inflamatória, principalmente anti-eosinofílica (Pizzichini et al., 1999) e que o efeito deste

antagonista de leucotrieno não está restrito somente a inibição de eosinófilos localmente, podendo agir de uma forma mais ampla e central, nas células progenitoras na medula óssea (Braccioni et al., 2002). Cabe ressaltar que ambos os tratamentos foram efetivos na redução das quimiocinas (eotaxinas e RANTES), tanto no parênquima distal quanto nas vias aéreas, reforçando as evidências já encontradas na literatura.

O processo de remodelamento, como já citado anteriormente, é bastante complexo e pode ser causado parcialmente por diversos fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento insulínico (IGF-I) (Hoshino et al., 1998).

Os níveis de IGF-I encontram-se significativamente elevados em biópsias brônquicas de pacientes asmáticos e está relacionado com a deposição de colágeno e também com a quantidade de fibroblastos, evidenciando a importante contribuição deste fator de crescimento não só para o processo de remodelamento, mas também para o processo inflamatório como um todo (Hoshino et al., 1998).

O IGF-I é capaz de induzir a síntese de colágeno e também a hiperplasia de células musculares lisas, além de ser considerado um potente mitógeno para fibroblastos e células musculares lisas (Jones, Clemmons, 1985; Goldstein et al., 1989).

Yamashita et al. (2005), estudando IGF-I em modelo experimental de asma em murinos, encontraram níveis elevados deste fator de crescimento em células do epitélio brônquico.

Em humanos, a expressão de IGF-I encontra-se significativamente elevada nas vias aéreas de pacientes com asma grave, quando comparados aos pacientes que possuem a forma mais leve da doença (Hoshino et al., 1998). Hoshino et al. (1998) investigaram os efeitos de corticoides inalatórios em pacientes asmáticos e

observaram redução significativa na deposição de colágeno subepitelial, além de redução na quantidade de fibroblastos e na expressão de fibronectina, sugerindo que a diminuição do conteúdo de colágeno esteja relacionada provavelmente com o bloqueio da transcrição do gene que codifica o IGF-I pelo corticosteroide.

Nossos resultados encontram-se de acordo com os dados evidenciados por Hoshino et al. (1998), uma vez que ambos os tratamentos utilizados neste estudo foram capazes de reduzir a expressão de IGF-I. Cabe ressaltar que ainda faltam estudos que aprofundem a relação deste fator de crescimento com os antagonistas de leucotrienos.

Apesar de ambos os tratamentos utilizados serem efetivos na redução da expressão de IGF-I, no parênquima pulmonar a dexametasona reduziu de maneira mais significativa a expressão deste fator de crescimento quando comparada ao montelucaste.

O IGF-I é sintetizado e secretado pelo fígado (Schwander et al., 1983), e os corticosteroides são medicamentos que atuam em uma série de doenças, incluindo as patologias do fígado (Tanner e Powell, 1979).

Gayan-Ramirez et al. (1999), mostraram que a administração de triancinolona (corticosteroide) em ratos foi capaz de diminuir os níveis séricos de IGF-I, provavelmente como resultado da diminuição da manifestação deste fator de crescimento no fígado.

As evidências acima surgem como uma provável explicação dos resultados que encontramos neste trabalho, justificando a ação mais significativa da dexametasona na redução da expressão de IGF-I no parênquima pulmonar distal.

Ainda tratando-se de remodelamento pulmonar, não podemos esquecer que a matriz extracelular desempenha um importante papel. O epitélio é constantemente

desafiado por estímulos inflamatórios e para manter sua integridade, vários mecanismos rápidos de reparo são acionados (Erjefalt et al., 1994; Kotton et al., 2004). Em condições normais, acredita-se que esse reparo seja feito de maneira ordenada e coordenada envolvendo a integridade da matriz extracelular e seu funcionamento (Zahm et al., 1991;Erjefalt et al., 1995). O remodelamento talvez aconteça em uma tentativa desenfreada de reparar a inflamação, perdendo a ordem e a coordenação do processo, mas sempre na tentativa de reparar um dano causado ao tecido.

A fibronectina é uma das primeiras proteínas da matriz extracelular produzidas pelas células epiteliais das vias aéreas (Sacco et al., 2004) que possui grande importância na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células epiteliais, evidenciando assim, o fato de a fibronectina participar do processo de reparo tecidual (Erjefalt et al., 1995; Hastie et al., 2002).

A fibronectina é considerada uma glicoproteína multifuncional que além de promover migração celular, participa do processo de reparo tecidual (Stevens et al., 2008).

Durante o reparo tecidual, já foi evidenciado que ocorre o processo de transformação de fibroblastos em miofibroblastos e que isso é essencial para o processo de reparo no epitélio de asmáticos (Tomasek et al., 2002).

In vitro, fibroblastos humanos diferenciam-se em miofibroblastos através da influência de fator de crescimento transformador (TFG- β), stress mecânico e fibronectina contendo um tipo extra dominante A III (Tomasek et al., 2002).

A fibronectina é depositada nas fibrilas da matriz extracelular e contém porções variáveis de sequências de tipo extra dominante A III e também de B (EDA

e EDB) (Pankow et al., 2002). Essas sequências estão envolvidas durante a ativação dos fibroblastos (Serini et al., 1998) e também no reparo tecidual (Muro et al., 2003).

Em pacientes asmáticos, a expressão de fibronectina extra dominante A III é mais proeminente quando comparada aos pacientes controle (Nam et al., 2012).

Em modelos experimentais, a fibronectina do tipo A III é altamente expressa logo após a deposição de colágeno e logo no início do processo de injúria ao tecido pulmonar (Hernnas et al., 1992). Os mecanismos fisiológicos pelos quais ocorrem a indução da fibronectina não estão bem esclarecidos.

Existiu uma dificuldade de encontramos na literatura trabalhos que evidenciassem a ação dos medicamentos estudados neste trabalho sobre a expressão da fibronectina.

Nossos resultados apontam uma diminuição da expressão de fibronectina tanto no parênquima pulmonar, quanto nas vias aéreas após o tratamento com montelucaste e dexametasona em animais sensibilizados com ovoalbumina.

O fator de transcrição nuclear NF- κ B é considerado um mediador central da inflamação na asma, pois é capaz de regular a expressão de uma série de genes que estão envolvidos na patologia molecular pulmonar (Charokopos et al., 2009). O NF- κ B é extremamente importante na resposta alérgica. Sendo assim Lin et al. (2000), utilizando ratos Brown-Norway que foram desafiados com ovoalbumina, verificaram que os fragmentos pulmonares desses animais exibiam uma alta atividade de NF- κ B.

Estudos *in vitro* demonstraram que os receptores de glicocorticoides podem agir impedindo o NF- κ B de interagir com seu sítio de ligação cis e também

impedindo que o NF- κ B ligue-se a outros fatores de transcrição e proteínas estruturais (Tuckermann et al., 1999; Tao et al., 2001).

Quando os receptores de glicocorticoides são ativados, uma série de eventos ocorrem para impedir o processo inflamatório, inclusive o impedimento da ligação de NF- κ B com os promotores (Ito et al., 2000; Ito et al., 2001).

Hancox et al. (1999) mostraram que em biópsias brônquicas de pacientes asmáticos o tratamento com budesonida foi capaz de reduzir a ligação entre NF- κ B e o DNA. Wilson et al. (2001) também demonstraram uma redução de NF- κ B ativado após o tratamento com budesonida.

Wu et al. (2006) demonstraram que a administração de montelucaste em cobaias com inflamação alérgica pulmonar foi capaz de inibir a ativação de NF- κ B no tecido pulmonar, contribuindo assim com a redução da resposta inflamatória em vias aéreas.

Em outro estudo, Maeba et al. (2005) demonstraram que em células mononucleares de pacientes asmáticos o tratamento com montelucaste foi capaz de inibir a ativação de NF- κ B, ocasionando redução da produção de substâncias inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e MCP-1.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura e apesar de os dois tratamentos analisados terem sido efetivos na redução de NF- κ B, nas vias aéreas o tratamento com dexametasona apresentou melhor eficácia quando comparado ao tratamento com montelucaste, fato que provavelmente está relacionado ao próprio mecanismo de ação dos corticosteroides.

Apesar de, na literatura existirem relatos da eficácia destes tratamentos no controle de alterações morfofuncionais presentes na asma, o presente estudo evidenciou que o tratamento isolado com as drogas utilizadas foi totalmente capaz de controlar as alterações no parênquima pulmonar distal. Além disso, os tratamentos utilizados foram administrados por via sistêmica, e não, através de inalação, o que provavelmente contribuiu para sua eficiência.

Neste modelo animal, tanto o tratamento com dexametasona quanto o com montelucaste foram efetivos no controle da resposta inflamatória no parênquima pulmonar distal e nas vias aéreas. Torna-se importante, no entanto, enfatizar o papel do montelucaste no controle de aspectos do remodelamento e também na resposta inflamatória, principalmente no parênquima pulmonar distal.

6. CONCLUSÕES

Utilizando modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias foi possível concluir no parênquima pulmonar distal que:

1. Os tratamentos isolados com montelucaste e dexametasona foram efetivos no controle da resposta inflamatória eosinofílica.
2. Nas células positivas para eotaxina, ambos os tratamentos foram efetivos, porém, o tratamento isolado com montelucaste foi mais eficiente no que diz respeito ao controle da resposta quando comparado ao tratamento com dexametasona.
3. Na avaliação de células positivas para RANTES, ambos tratamentos foram efetivos.
4. Em relação às células positivas para IGF-I, notamos uma melhor resposta no tratamento com dexametasona, apesar da eficiência de ambos tratamentos.
5. Na avaliação de células positivas para fibronectina, ambos tratamentos foram efetivos.
6. Na avaliação de células positivas para NF- κ B, ambos tratamentos foram efetivos.

Utilizando modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias foi possível concluir nas vias aéreas que:

1. Os tratamentos isolados com montelucaste e dexametasona foram efetivos no controle da resposta inflamatória eosinofílica.
2. Na avaliação de células positivas para eotaxina, ambos tratamentos foram efetivos, porém, foi possível observar uma melhor resposta no tratamento com dexametasona.
3. Na avaliação de células positivas para RANTES, ambos tratamentos foram efetivos.
4. Na avaliação de células positivas para IGF-I ambos tratamentos foram efetivos.
5. Na avaliação de células positivas para fibronectina, ambos tratamentos foram efetivos.
6. Em relação ao fator de transcrição NF- κ B, notamos uma melhor resposta no tratamento com dexametasona, quando comparado ao montelucaste.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cell and Mol Immunol* 2000; 4:424-444.
- Abdel Aziz RR, Helaly NY, Zalata KR, Gameil NM. Influence of inhaled beclomethasone and montelukast on airway remodeling in mice. *Inflammopharmacology* 2012 (Epub ahead of print).
- Alam R, Forsythe P, Stafford S, Fukuda Y. Transforming growth factor β abrogates the effects of hematopoietins on eosinophil and induces their apoptosis. *J Exp Med*. 1994; 179:1041-5.
- Alam R, York J, Boyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N. Increased MCP-1, RANTES, and M1P-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1398-1404.
- Alves RSA, Vianna FAF, Pereira CAC. Fenótipos clínicos de asma grave *J Bras Pneumol*. 2008; 34(9):646-6533.
- 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 mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294(6):L1197-205.
- Arnoux B, Joseph M, Simoes MH, Tonnel AB, Duroux P, Capron A, Benveniste J. Antigenic release of paf-acether and beta-glucuronidase from alveolar macrophages of asthmatics. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1987; 23(2):119-24.
- Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of activated T activated lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1990; 142: 1407-1413.
- Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107:3-6.
- Barnes PJ, Adcock J. Anti-inflammatory actions of steroids molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 1993; 14(12):436-41.
- Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(5 Pt 2):S42-9.
- Barnes PJ, Adcock J. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 1997; 18(2):46-50
- Barnes PJ. Glucocorticosteroids. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, ed. *Asthma - Basic mechanisms and clinical management*. 3.ed. San Diego, Academic Press, 1998. p.725-766.
- Barrett JR. Chemokines. *Blood* 1997; 90:909-928.

Berkman N, Krishnan VL, Gilbey T, Newton R, O'Connor B, Barnes PJ, Chung KF. Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1804-1811.

Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von Tscharner V, Baggiolini M, Dahinden CA. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol* 1993; 23:761-767.

Bjermer L. History and future perspectives of treating asthma as a systemic and small airways disease. *Respir Med*. 2001; 95(9):703-19.

Blain JF, Sirois P. Involvement of LTD4 in allergic pulmonary inflammation in mice: modulation by cysLT, antagonist MK-571. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 2000; 62(6):361-368.

Bousquet J, Chanez P, Barneon JY, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N.Engl.J.Med* 1990; 323:1033-1039.

Bousquet J. Global initiative for asthma (GINA) and its objectives. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30 Suppl 1:2-5.

Braccioni F, Dorman SC, O'byrne PM, Inman MD, Denburg JA, Parameswaran K, Baatjes AJ, Foley R, Gauvreau GM. The effect of cysteinyl leukotrienes on growth of eosinophil progenitors from peripheral blood and bone marrow of atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 110(1):96-101.

Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(6):1277-84.

Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108(2 Suppl):S65-71.

Brown, J.R., et al. Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin. Exp. Immunol* 1998; 114:137-146.

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

Busse WW. Inflammation in asthma: The cornerstone of the disease and target of therapy. *J. Allergy Clin. Immunol*. 1998a; 102: S17-S22.

Busse WW, Lemanske RF Jr Asthma. *N Engl J Med*. 2001; 344(5):350-62.

Cengizlier R, Demirpolat E, Tülek N, Cakmak F. Circulating ICAM-1 levels in bronchial asthma and the effect of inhaled corticosteroids. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000; 84(5):539-41.

Charokopos N, Apostolopoulos N, Kalapodi M, Leotsinidis M, Karamanos N, Mouzaki A. Bronchial Asthma, Chronic Obstructive Pulmonary Disease and NF-kB. *Current Med Chem* 2009; 16: 867-83.

Chensue SW, Warmington KS, Allenspach EJ, Lu B, Gerard C, Kunkel SL, Lukacs NW. Differential expression and cross regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* 1999; 163:165-173.

Chibana K, Ishii Y, Asakura T, Fukuda T. Up-regulation of cysteinyl leukotriene 1 receptor by IL-13 enables human lung fibroblasts to respond to leukotriene C4 and produce eotaxin. *J Immunol* 2003; 170(8):4290-5.

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

Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AEI, Power CA, Baggiolini M, Wells TNC. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4 and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* 2000; 96:4046-4054.

Clemmons DR, Van Wyk JJ. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts porcine smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1985; 75:1914-8.

Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJA, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1997; 7: 235-43.

Corrigan CJ, Kay AB. CD₄⁺ T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1991; 94: 270-271.

Coyle AJ, Uchida D, Ackerman SJ, Mitzner W, Irvin CG. Role of cationic proteins in the airway. Hyperresponsiveness due to airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1994; 150(5):S63-S71.

Crapster-Pregont M, Yeo J, Sanchez RL, Kuperman DA. Dendritic cells and alveolar macrophages mediate IL-13-induced airway inflammation and chemokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 (Epub ahead of print).

de Kluiver j, Schrumpf JA, Evertse CE, Sont JK, Roughley PJ, Rabe KF, Hiemstra PS, Mauad T, Sterk PJ. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(10):1361-9.

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

De Magalhães SS, dos Santos MA, da Silva OM, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, Martins AM, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35:602-11.

Diamant Z, Mantzouranis E, Bjermer L. Montelukast in the treatment of asthma and beyond. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009; 5(6):639-58.

Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantification of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am.Rev.Respir.Dis* 1990b; 142:863-871.

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

Ebina M, Takahashi T, Chiba T, Motomiya M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148(3):720-6.

Erjefält JS, Erjefält I, Sundler F, Persson CG. Microcirculation-derived factors in airway epithelial repair in vivo. *Microvasc Res*. 1994; 48(2):161-78.

Erjefält JS, Erjefält I, Sundler F, Persson CG. In vivo restitution of airway epithelium. *Cell Tissue Res*. 1995; 281(2):305-16.

Fonseca JA, Botelho C Asma grave: Definição *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 2006;29(2):70-76 Revisão.

Fonseca JA. Custos da doença alérgica. *Rev. Port. Imunoalergol* 2003; 11: 268-283.

Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab Invest* 1980; 42: 35-42.

Fujisawa T. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR3. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:507-513.

Galli SJ. Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. *J Exp Med*. 1997; 186(3):343-7.

Garcia MLB, Paiva PSO, Dolhnikoff M, Jancar S, Saldiva PHN, Martins MA. Airway and pulmonary tissue responses to Platelet-Activating Factor in rats. *Exp Lung Res*. 1994; 20:169-84.

Gayan-Ramirez G, Vanderhoydonc F, Verhoeven G, Decramer M. Acute treatment with corticosteroids decreases IGF-1 and IGF-2 expression in the rat diaphragm and gastrocnemius. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(1): 283-9.

Giavina-Bianchi P, Aun MV, Bisaccioni C, Agondi R, Kalil J. Difficult-to-control asthma management through the use of a specific protocol. *Clinics* 2010; 65:905-918.

Gibson PG, Allen CJ, Yang JP, Wong BJO, Dolovich J, Denburg J, Hargreave JE. Intraepithelial mast cells in allergic and non allergic asthma: assessment using bronchial brushings. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1993; 148:80-86.

Gibson PG, Wlodarczyk J, Hensley MJ, Muree-Allen K, Olson LG, Saltos N. Using quality-control analysis of peak expiratory flow recordings to guide therapy for asthma. *Ann Intern Med* 1995; 123:488-92.

Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophil leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 1986; 39:177-253.

Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and Prevention Program*. National Heart, Lung, and Blood Institute/World Health Organization. Workshop Report. Washington, U.S. Department of Health, Education, and Welfare. 2010. Available from www.ginasthma.org. Date last updated, 2010. Publication No. 02-3659.

Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. *Eur Respir J*. 2002; 19(1):61-7.

Goldstein RH, Poliks CF, Pilch PF, Smith BD, Fine A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology* 1989; 124(2):964-70

Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A, Martinez-A C, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998; 188:157-67.

Green RH, Brightling CE, McKenna S, et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360:1715.

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

Hanazaki M, Chiba Y, Yokoyama M, Morita K, Kohjitani A, Sakai H et al. Y-27632 augments the isoflurane-induced relaxation of bronchial smooth muscle in rats. *J Smooth Muscle Res* 2008; 44:189-193.

Hargreave FE, Dolovich J, Newhouse MT. The assessment and treatment of asthma: a conference report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 85(6):1098-1111.

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

Harris RR, Carter GW, Bell RL, Moore JL, Brooks DW. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 17(2):147-156.

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.

Hastie AT, Kraft WK, Nyce KB, Zangrilli JG, Musani AI, Fish JE, Peters SP. Asthmatic epithelial cell proliferation and stimulation of collagen production: human asthmatic epithelial cells stimulate collagen type III production by human lung myofibroblasts after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2):266-72,

Hawrylowicz CM; O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 271-283.

Heath H, Qin S, Rao P, Wu L, LaRosa G, Kassam N, et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrate using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1997; 99:178-184.

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

Henderson Jr WR, Chiang GKS, Tien Y-T, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT₁ receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 173:718-28.

Henderson Jr WR, Tang L-I, Chu S-J, Tsao S-M, Chiang GKS, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:108-16.

Hernnas J, Nettelbladt O, Bjermer L, Sarnstrand B, Malmstrom A, Hallgren R. Alveolar accumulation of fibronectin and hyaluronan precedes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Eur Respir J* 1992; 5:404-10.

Hill DJ, Strain AJ, Elstow SF, Sweeney I, Milner RDG. Bifunctional action of transforming growth factor β on DNA synthesis in early passage human fetal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1986; 128:322-8.

Hocking DC. Fibronectin matrix deposition and cell contractility - Implications for airway remodeling in asthma. *Chest* 2002; 122:275S-8S Review.

Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ, Yamashiro Y, Uchida K, Hosaka K, Isogai S. Inhaled corticosteroid reduced lamina reticularis of the basement membrane by modulation of insulin-like growth factor (IGF)-I expression in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28(5):568-77.

Holgate ST, Finnerty JP. Recent advances in understanding the pathogenesis of asthma and its clinical implications. *Quart. J. Med. New Series* 66 1988; 249:5-19.

Hutson PA, Church MK, Clay TP, Holgate ST. Early and late phase bronchoconstriction after allergen challenge of non-anesthetized guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 137:548-557.

Ishida K, Kelly LJ, Thomson RJ, Beattie LL, Schellenberg RR. Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1989; 67(3):1133-9.

Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin 1 beta induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 2000; 20:6891-6903.

Ito K, Jazrawi E, Cosio B, Barnes PJ, Adcock IM. P65-Activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65-HAT complex. *J Biol Chem* 2001; 276:30208-30215.

IV Consenso Brasileiro para o Manejo da Asma [IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma – SBPT]. *J Bras Pneumol*. 2006;32(7):S447-74.

James A. Remodelling of airway smooth muscle in asthma: what sort do you have? *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(6):703-7.

Jancar S. Imunidade natural e inflamação. In: Calich V, Vaz C. *Imunologia básica*. São Paulo, Revinter, 2001. p.11-30.

Joos S, Miksch A, Szecsenyi J, Wieseler B, Grouven U, Kaiser T, Schneider A. Montelukast as add-on therapy to inhaled corticosteroids in the treatment of mild to moderate asthma: a systematic review. *Thorax* 2008; 63(5):453-62. Review.

Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Mogbel R, et al. Eotaxin: cloning of an eosinophil chemoattractant cytokine and increased mRNA expression in allergen-challenged guinea-pig lungs. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:788-794.

Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 1992; 176:587-592.

Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 851:139-46.

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

Khalil N, Greenberg AH. The role of TGF-beta in pulmonary fibrosis. *Ciba Found Symp* 1991; 157:194-207.

Kinsella MG, Bressler SL, Wight TN. The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004; 14:203-34.

Knorr B, Franchi LM, Bisgaard H, Vermeulen JH, LeSouef P, Santanello N, Michele TM, Reiss TF, Nguyen HH, Bratton DL. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of persistent asthma in children aged 2 to 5 years. *Pediatrics* 2001; 108(3):E48.

Kotton DN, Summer R, Fine A. Lung stem cells: new paradigms. *Exp Hematol*. 2004; 32(4):340-3.

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

Kraft M. Part III: Location of asthma inflammation and the distal airways: clinical implications. *Curr Med Res Opin*. 2007; 23(3):S21-7.

Kroegel C, Virchow JC, Luttmann W, Walker C, , Warner JA. Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (part I). *Eur Respir J* 1994; 7:519.

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

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T, Vilkkla V, Spur BW, Lee TH. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet*. 1993 17; 341(8851):989-90.

Lamkhioed B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepada EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O , et al. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol* 1997; 159:4593-4601.

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

Lane TE, Paoletti AD, Buchmeier MJ. Disassociation between the in vitro and in vivo effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J Virol*. 1997; 71(3):2202-10.

Leick-Maldonado EA, Lemos M, Tibério IF, Caldini EG, Montes GS, Martins MA, Saldiva PH. Differential distribution of elastic system fibers in control and bronchoconstricted intraparenchymatous airways in the guinea-pig lung. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1997; 29(4):427-34.

Leick-Maldonado EA, Kai 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; 34:145-52.

Leick EA, Reis FG, Honorio-Neves FA, Almeida-Reis R, Prado CM, Martins MA, Tibério IF. Effects of repeated stress on distal airway inflammation, remodeling and mechanics in an animal model of chronic airway inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2012; 19(1):1-9.

Leckie MJ, ten Brinke A, Jamey Khan, Zuzana Diamant, Brian J O'Connor, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000; 356:2144-2148.

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

Lenardo MJ, Baltimore D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell*. 1989; 58(2):227-9.

Lillard JW, Boyaka PN, Taub DD, McGhee JR. RANTES potentiates antigen-specific mucosal immune responses. *J Immunol* 2001; 166:162-169.

Limper AH, Roman J. Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest* 1992; 101:1663-73.

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

Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL. C-C chemokine induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 1996; 60:573-578.

Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, Kunkel SL. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol* 1997; 158:4398-4404.

Luna LG. AFIP manual of histologic staining methods. *New York: Mc Graw Hill*. 1986.

Maeba S, Ichiyama T, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Effect of montelukast on nuclear factor kappaB activation and proinflammatory molecules. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 94(6):670-4.

Manning P, Gibson PG, Lasserson TJ. Ciclesonide versus other inhaled steroids for chronic asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (2):CD007031.

Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG. Exaggerated spontaneous release of platelet derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1987; 317:202-9.

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

Matsukura S, Kokubu F, Kubo H, Tomita T, Tokunaga H, Kadokura M, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Ohno T, Suzuki H, et al. Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:225-264.

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernard FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004; 170(8):857-62.

McFadden ER Jr. Dosages of corticosteroids in asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147(5):1306-10.

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

Mengelers HJ, Maikoe T, Brinkman L, Hooibrink B, Lammers JW, Koenderman L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1994; 149(2):345-351.

Ministério da Saúde [Internet]. Secretaria Executiva. Datasus [acesso em set. 2010]. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>

Minoguchi K, Kohno Y, Minoguchi H, Kihara N, Sano Y, Yasuhara H, Adachi M. Reduction of eosinophilic inflammation in the airways of patients with asthma using montelukast. *Chest* 2002; 121(3):732-738.

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

Moore WC, Peters SP. Severe asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 487-494.

Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Laconcig A, Porro F, Stanta G, Baralle FE. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* 2003; 162:149-60.

Nakamura H. Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1952-1956.

Nakashima AS, Prado CM, Lanças T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. *J Appl Physiol* 2008; 104(6):1778-85.

Nam YH, Lee SK, Sammut D, Davies DE, Howarth PH. Preliminary study of the cellular characteristics of primary bronchial fibroblasts in patients with asthma: expression of alpha-smooth muscle actin, fibronectin containing extra type III domain A, and smoothelin. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; 22(1):20-7.

National Institutes of Health / Health Research Extension Act of 1985, Public Law 99-158, November 20, 1985, "Animals in Research" U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and

Training Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm#USGovPrinciples>

Naura AS, Zerfaoui M, Kim H, Abd Elmageed ZY, Rodriguez PC, Hans CP, Ju J, Errami Y, Park J, Ochoa AC, Boulares AH. Requirement for inducible nitric oxide synthase in chronic allergen exposure-induced pulmonary fibrosis but not inflammation. *J Immunol* 2010; 185(5):3076-85.

Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T, Alam R, Crowe SE, Mei F, Ogra PL, Garofalo RP. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1 and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 1998; 72:4756-4764.

Palframan RT, Collins PD, Severs NJ, Rothery S, Williams TJ, Rankin SM. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Exp Med*. 1998a; 188:1621-1632.

Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood* 1998b; 91:2240-2248.

Pankow R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002; 115:3861-3.

Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116:477-86.

Pesci A, Foresci A, Bertorelli G, Chetta A, Olivieri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am.Rev.Resp.Dis*. 1993; 147: 684-689.

Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF et al. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *Eur Respir J* 1999; 14(1): 12-8.

Pope SM, Brandt EB, Mishra A, Hogan SP, Zimmermann N, Matthaei KI, Foster PS, Rothenberg ME. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 108(4):594-601.

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

Profita M, Gagliardo R, Di Giorgi R, Pompeo F, Gjemarkaj M, Nicolini G, Bousquet J, Vignola AM. Biochemical interaction between effects of beclomethasone dipropionate and salbutamol or formoterol in sputum cells from mild to moderate asthmatics. *Allergy*. 2005; 60(3):323-9

Rabinovitch N, Reisdorph N, Silveira L, Gelfand EW. Urinary leukotriene E4 levels identify children with tobacco smoke exposure at risk for asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128(2):323-7.

Roberts AB. The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13:3-5.

Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine Mrna expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J.Allergy.Clin.Immunol* 1993; 92:313-324.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1981; 1(8637):520-4.

Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol* 2002; 38:881-885.

Sacco O, Silvestri M, Sabatini F, Sale R, Defilippi AC, Rossi GA. Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Pediatr Respir Rev.* 2004; 5 Suppl A:S35-40.

Schall TJ, Jongstra J, Dyer BJ, Jorgensen J, Clayberger C, Davis MM, Krensky AM. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988; 141:1018-1025.

Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; 347:669-671.

Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.* 1991; 10(12):3805-17.

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

Schimmer BP, Parker KL. Hormônio adrenocorticotrófico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman-Gilman A. ed. As bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1996. p.1082-1102.

Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 1983; 113(1): 297-305.

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geninot A, Borsi L, Zardi L, Gabbiani G. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor beta-1. *J Cell Biol* 1998; 142:873-81.

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

Siersted HC, Mostgaard G, Hyldebrandt N, Hansen HS, Boldsen J, Oxhøj H. Interrelationship between diagnosed asthma, asthma like symptoms, and abnormal airway behavior in adolescence: the Odense Schoolchild Study. *Thorax* 1996; 51:503-9.

Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J.Immunol* 1997; 118:7-14.

Simon HU, Alam R. Regulation of eosinophil apoptosis: transduction of survival and death signals. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 118:7-14.

Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology* 2006;11:54.

Smith LJ. Comparative efficacy of inhaled corticosteroids and antileukotriene drugs in asthma. *Biodrugs*. 2001; 15(4):239-49.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. II Consenso brasileiro no manejo da asma. *J Pneumol* 1998; 4:173-276.

Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, Sociedade Brasileira de Pediatria, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002; 28:1-28.

Soma T, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Uematsu K, Nagata M. Inhibitory effect of budesonide alone and in combination with formoterol on IL-5 and RANTES production from mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 Suppl 1:22-7.

Spoelstra FM, Postma DS, Kauffman HF Mutual activation of pulmonary fibroblasts and eosinophils, and modulation by drugs in relation to asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(6):808-16.

Stellato C, Brummet EM, Plitt RJ, Shahabuddin S, Baroody MF, Liu CM, et al. Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2001; 166:1457-1461.

Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P. A randomized, double-blind trial of the effect of treatment with montelukast on bronchial hyperresponsiveness and serum eosinophilic cationic protein (ECP), soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R), IL-4, and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109(2):257-63.

Sugiura H, Komaki Y, Koarai A, Ichinose M. Nitrate stress in refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(2):355-60.

Tanner AR, Powell LW. Corticosteroids in liver disease: possible mechanisms of action, pharmacology, and rational use. *Gut* 1979; 20(12): 1109-24.

Tao Y, Williams-Skipp C, Scheinman RI. Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276:2329-2332.

Tateno H, Nakamura H, Minematsu N, Nakajima T, Takahashi S, Nakamura M, et al. Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Respir Med* 2004; 98:782-90.

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

Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity proliferation and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 1996; 59:81-89.

Teran LM, Carroll MP, Shute JK, Holgate ST. Interleukin 5 release into asthmatic airways 4 and 24 hours after endobronchial allergen challenge: its relationship with eosinophil recruitment. *Cytokine* 1999; 11:518-522.

Teran LM. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today* 21: 235-42, 2000.

Teran LM, Ledesma-Soto Y, Krengel S, Lezcano-Meza D. Eotaxinas em asma bronquial y poliposis nasal. *Gac Méd Méx* 2006; 142(2): 139-144.

Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38(10):1647-53.

Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155:1739-47.

Tiddens H, Silverman M, Bush A. The role of inflammation in airway disease: remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(2 Pt 2):S7-10.

Tiffany HL, Alkhatib G, Combadiere C, Berger EA, Murphy PM. CC chemokine receptors 1 and 3 are differentially regulated by IL-5 during maturation of eosinophilic HL-60 cells. *J Immunol* 1998; 160:1385-1392.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:349-63.

Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schutz G, Angel P. The DNA binding independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1 dependent genes in skin. *J Cell Biol* 1999; 147:1365-1370.

Van Helmont JB. Oriatrike or Physick Refined. *London: L Lloyd*; 1662: 356-373.

Venge P, Bergstrand H, Hakansson L. Neutrophils and eosinophils. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. *Textbook of rheumatology*. Philadelphia, WB Saunders. 1996; 146-160.

Venge P. Eosinophils. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC. *Asthma- Basic mechanisms and clinical management*. San Diego, Academic Press. 1998; 3: 141-157.

Veraldi KL, Gibson BT, Yasuoka H, Myerburg MM, Kelly EA, Balzar S, Jarjour NN, Pilewski JM, Wenzel SE, Feghali-Bostwick CA. Role of insulin-like growth factor binding protein-3 in allergic airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180:611-7.

Vidal C, Fernández-Ovide E, Piñeiro J, Nuñez R, González-Quintela A. Comparison of montelukast versus budesonide in the treatment of exercise-induced bronchoconstriction. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001; 86(6):655-8.

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

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, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003; 123(3 Suppl):417S-22S.

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

Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin. Immunol*. 1991; 88: 935-942.

Walker C, Bode E, Boer L, Haansel TT, Blaser K, Virchow JC. Allergic and non-allergic asthmatics have distinct patterns of T cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1992; 146: 109-115.

Wanner A, Abraham WM, Douglas JS, Drazen JM, Richerson HB, RAM JS. NHLBI Workshop summary. Models of airway hyperresponsiveness. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1990; 141:253-257.

Ward C, Walters H. Airway wall remodelling: the influence of corticosteroids. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(1):43-8.

Warth MPTN, Maldonado EAL, Fernezlian SM, Leme AS, Perini A, Saldiva PHN, Martins MA. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. *Am J Physiol*. 1995; 268:L781-8.

Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N Sugata, Takai T and Nishizaki K. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Resp Crit Care Med*. 2004; 169:105-12.

Wenzel SE. A different disease, many diseases or mild asthma gone bad? Challenges of severe asthma. *Eur Respir J*. 2003; 22: 397-398.

Wilson JW, Djukanovic R, Howarth PH, Holgate ST. Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthma. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1992; 145: 958-960.

Wilson SJ, Wallin A, Della-Cioppa G, Sandstrom T, Holgate ST. Effects of budesonide and formoterol on NF-κB, adhesion molecules, and cytokines in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1047-1052.

World Health Organization. World Health Report 2000 making a difference. Geneva, WHO, 2000.

Wu AY, Chik SC, Chan AW, Li Z, Tsang KW, Li W. Anti-inflammatory effects of high-dose montelukast in an animal model of acute asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(3):359-66.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:829-37.

Xu L, Olivestein R, Martin JG, Powell WS. Inhaled budesonide inhibits OVA-induced airway narrowing inflammation and cys-LT synthesis in BN rats. *J.Appl.Physiol* 2000; 89:1852-1858.

Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Arai H, Nagase H, Adachi T, Ohta K. Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling. *Cell Immunol* 2005; 235(2):85-91.

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

Yasmin D, Kluthe C, Buschermohle T, Barg, Knob S, Kapp A, et al. IL-13 induces down-regulation of CCR3 protein and mRNA in human eosinophils. *J Immunol* 2001; 167:3443-3453.

Yoshikawa S, Kayes SG, Parker JC. Eosinophils increase lung microvascular permeability via the peroxidase-hydrogen peroxide-halide system: bronchoconstriction and vasoconstriction unaffected by eosinophil peroxidase inhibition. *Am.Rev. Respir. Dis* 1993; 147:914-920.

Yousefi S, Hoessli DC, Blaser K, Mills GB, Simon HU. Requirement of lyn and syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokine in human eosinophils. *J.Exp.Med* 1996; 183(4):1407-1414.

Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and (MCP-4) and CC chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatic. *J Immunol* 1999; 163:6321-6329.

Zahm JM, Chevillard M, Puchelle E. Wound repair of human surface respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:242-248

Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1984. p.206-35.

Zheutlin LM, Acherman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J. Immunol* 1984; 133:2180-2185.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-127.