**LUCIANA RITHA DE CÁSSIA ROLIM BARBOSA
ARISTÓTELES**

**Modulação da mecânica do tecido pulmonar periférico e da
resposta do estresse oxidativo pela inibição da arginase e da iNOS
em modelo experimental de inflamação crônica pulmonar**

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: Profa. Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério

**SÃO PAULO
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Aristóteles, Luciana Ritha de Cássia Rolim Barbosa

Modulação da mecânica do tecido periférico e da resposta do estresse oxidativo pela inibição da arginase e da iNOS em modelo experimental de inflamação crônica pulmonar / Luciana Ritha de Cássia Rolim Barbosa Aristóteles. -- 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: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

Descritores: 1.Arginase 2.Asma 3.Inflamação alérgica crônica 4.Estresse oxidativo 5.NF-kappa B 6.Óxido nítrico sintase

USP/FM/DBD-026/12

O Amor é o motivo de
todos os motivos
Lacan.

Dedicatória

Minha família merece poucas palavras, mas aquelas que me são mais caras. Obrigada por vocês existirem. Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós havia atingido antes. Mas esse orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de a cada dia ser mais digno de representá-los. Obrigada José Antenor Aristóteles e Maria das Dores Aristóteles, por desde cedo me ensinaram o real sentido do amor, do caráter e respeito ao próximo. Não tenho como traduzir em palavras o meu amor por vocês.

Nesta jornada aprendi que uma tese é a extensão da vida do autor. Então, para que algo de valor seja produzido, a pessoa deve primeiro criar algo de valor dentro de si. Pessoa e obra são consistentes com o resultado. Por este motivo agradeço sincera e profundamente à Dra Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério, minha orientadora que muito me encorajou e me ajudou a produzir algo de valor em minha vida. Pessoa de inteligência marcante, sabedoria ímpar, que sempre nos acalma com sua sutil condução para a direção certa. Enfim resta-me agradecer por acreditar em mim.

À Débora Mikola, que sempre presente, muitas vezes enxugou o meu pranto e vibrou com o meu canto. Obrigada pela paciência e compreensão. A você, o meu eterno amor.

À Cláudia Jeanne Claudino de Pontes, irmã e amiga de todas as horas, que na maior das tempestades me pegou pela mão e me ensinou que “nada é nunca, nunca é não”. As circunstâncias tentam nos afastar, mas o amor que nos une, não. A você gostaria de agradecer com duas palavras que brotam do íntimo de minha alma: Muito obrigada.

Agradecimentos

Considerando esta tese como resultado de uma caminhada que não começou na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

À Carla Máximo pelo apoio e ensinamentos. A velocidade do seu raciocínio é algo marcante e apreciador. Confesso que nas inúmeras dúvidas que tirei com você foi de uma valia essencial, mesmo que eu levasse minutos ou horas para compreendê-la, afinal, acompanhar esta cabecinha aí é mérito para poucos. Muito obrigada minha querida.

À Edna Maldonado, minha querida amiga que carinhosamente a chamo de digníssima. Este trabalho teve muito de sua colaboração. Não esqueço o dia que você me pegou pela mão e me ensinou a ler lâminas. Obrigada por estar comigo na realização das fotos, dos gráficos e das correções desta tese, enfim, em cada etapa deste trabalho, sua ajuda e companhia foram fundamentais. Obrigada DD.

Ao Prof. Milton de Arruda Martins, médico e pesquisador conceituado. Só tenho a agradecer pela oportunidade de estar em um laboratório maravilhoso e de conviver com pessoas especiais.

À Cláudia Starling e Patrícia Angeli minhas companheiras nesta longa jornada, como esquecê-las? Cláudia Starling, que me acompanhou desde o início dos experimentos com a sua sabedoria e alegria. Saudades das risadas e companhia. Patrícia Angeli, minha companheira das tardes com os nossos queridos alunos, quanta saudade. Foi por meio dela que conheci a linda família LIM 20. Deixo registrado o meu afeto e gratidão. O meu ciclo de amizade ficou mais colorido com vocês. Muito obrigada.

À Prof^a Luciana Caperuto, sua doçura e profissionalismo me fizeram respeitá-la e admirá-la. Conheci a Prof^a Luciana, naquele momento que quase todo pesquisador passa. Depois de tudo pronto, eis que surge a necessidade de acrescentar mais dados ao trabalho. Fui recebida de braços abertos, e saí do seu laboratório com a alegria do dever cumprido. Divido com você a minha alegria. Minha gratidão a você.

À Nathalia Montoro, uma menina encantadora e de uma experiência prática admirável. A oportunidade de trabalhar em conjunto com uma pessoa tão especial é, sem dúvida, um grande aprendizado. Obrigada garota sucesso.

À Rosana Banzato obrigada pelos conselhos e pelo carinho tão especial, pela paciência que tem em me escutar sempre que é necessário, pela ajuda na tese e pelas opiniões precisas e valiosas. Você é uma mulher encantadora.

À Simpaticíssima Flávia Ribas que na hora certa mostrou ser amiga. Realmente o seu apoio veio confirmar a boa impressão que sempre tive de você. Muito obrigada.

As queridíssimas e amigas Roseli Moraes e Simone Sato. Sou grata a vocês pela minha trajetória acadêmica na Universidade Guarulhos. O meu segundo lar que tanto me dá paz. Com Simone Sato aprendi com a sua fortaleza e com Roseli Moraes a ter calma e paciência quando o mundo diz não. Sintam-se abraçadas e com vocês comemoro esta conquista.

À Rosana, secretária deste laboratório. Sempre que se fazia jus, seu apoio estava lá. Obrigada, particularmente com as questões burocráticas e também por poder contar com a sua amizade, e como não

poderia esquecer as balas que adoçaram os meus dias de concentração, sempre disponíveis em sua mesa. Você é muito especial.

À chefia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, Carlos Costa e Sandra Vitti pelo apoio e por sempre dizer sim quando necessitei trocar horários e plantões. E como não poderia esquecer aos meus colegas de trabalho. Vocês dispararam fácil um sorriso meu. Um beijo em cada um.

Aos meus alunos, anjos que esbanjam pureza. Vocês fazem parte do meu engrandecimento pessoal e profissional. Não tenho sala fixa, mas o meu coração estará sempre aberto para recebê-los.

Meu agradecimento especial as demais pessoas que contribuíram também profissionalmente com a realização deste trabalho. Ricardo Marques, Renato Righetti, Julie Silva, Sandra e Esmeralda da imunohistoquímica e David do biotério.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Asma Brônquica.....	2
1.1.2 Definição e Aspectos Fisiopatológicos.....	5
1.1.3 Aspectos Clínicos.....	9
1.2 Importância da Avaliação do Tecido Pulmonar Periférico.....	12
1.3 Óxido Nítrico e Asma.....	16
1.4 Complexo Óxido Nítrico-Arginase.....	22
1.5 Óxido Nítrico e o Estresse Oxidativo.....	27
1.6 Justificativa.....	36
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	41
3.1 Grupos Experimentais.....	42
3.2 Protocolo de Sensibilização.....	43
3.3 Tratamento Crônico com 1400W.....	45
3.4 Administração de nor-NOHA.....	45

3.5	Avaliação de Mecânica Oscilatória de Tecido Pulmonar Periférico - Obtenção e Preparação do Tecido.....	46
3.6	Análise Morfométrica.....	49
3.6.1	Imunohistoquímica Para Detecção de Células iNOS Positivas.....	50
3.6.2	Imunohistoquímica Para Detecção de Expressão de Arginase 2 e NFkB.....	52
3.6.3	Imunohistoquímica Para Detecção de Expressão de PGF2.....	54
3.6.4	Detecção da Atividade de Arginase 2.....	55
3.7	Análise Estatística.....	57
4.	RESULTADOS.....	58
4.1	Medidas de Mecânica Oscilatória.....	59
4.2	Análise Morfométrica.....	62
4.3	Medidas de Expressão de Arginase 2.....	63
4.4	Medidas de Atividade de Arginase 2.....	65
4.5	Avaliação do Número de Células iNOS Positivas.....	67
4.6	Medidas de Expressão de Isoprostano PGF2 α	69
4.7	Medidas de Expressão de NF-kB.....	71
4.8	Análise Descritiva.....	73
5.	DISCUSSÃO.....	79
6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Mecanismos Fisiopatológicos da Asma Brônquica.....	07
FIGURA 2- Esquema Demonstrativo das Vias de Produção de Óxido Nítrico e Arginase.....	25
FIGURA 3 - Esquema Representativo dos Estímulos que Ativam NFkB.....	35
FIGURA 4 - Esquema Representativo Demonstrando a Translocação do NFkB Para o Núcleo.....	36
FIGURA 5 - Esquema do Protocolo de Sensibilização e Tratamento Utilizado.....	44
FIGURA 6 - Esquema Representativo do Aparato Experimental Para Medida da Mecânica Tecidual de Tecido Pulmonar Periférico.....	49
FIGURA 7 - Esquema da Avaliação Morfométrica e Histopatológica.....	50
FIGURA 8 - Valores do Percentual de Aumento de Resistência Tecidual.....	60
FIGURA 9 - Valores do Percentual de Aumento de Elastância Tecidual.....	61
FIGURA 10 - Valores da Porcentagem de Expressão de Arginase 2 nos Septos Alveolares.....	64
FIGURA 11 - Valores da Atividade da Arginase Nos Septos Alveolares.....	66
FIGURA 12 - Valores de Células iNOS Positivas Nos Septos Alveolares.....	68
FIGURA 13 - Valores da Proporção de Volume de Isoprostano PGF2 α Nos Septos Alveolares.....	70
FIGURA 14 - Valores da Proporção do Volume de NFkB Nos Septos Alveolares.....	72
FIGURA 15 - Fotomicrografias de Parênquima Pulmonar dos Grupos Submetidos à Coloração Imunohistoquímica Para Detecção de Arginase e iNOS.....	74

FIGURA 16 - Fotomicrografias de Parênquima Pulmonar dos Grupos Submetidos à Coloração Imunohistoquímica Para Detecção de NFkB e Isoprostano PGF2 α .77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Redução Mundial na Prevalência dos Sintomas de Asma em Crianças de 6 – 7 Anos e 13 – 14 Anos.....	04
TABELA 2 - Proporção de Alvéolos no Tecido Pulmonar Periférico.....	62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Características Clínicas da Asma Controlada, Parcialmente Controlada e Não Controlada.....	10
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%Et	Porcentagem de aumento da elastância tecidual
%Rt	Porcentagem de aumento da resistência tecidual
1400W	N-(3-(aminomethyl)benzil)acetamidina-inibidor específico da iNOS
8-iso-PGF-2α	Principal membro da classe F2-isoprostano
AHR	Hiperresponsividade das vias aéreas
BEC	S-(2-boronoetil)-L-cisteína - Inibidor específico da arginase
CAT	Sistema de Transporte Aminoácido Catiônico
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAR	Reação asmática imediata
EGF	Fator de crescimento epidermal
eNOS	Óxido Nítrico Endotelial
EP	Erro padrão
ESF	Equipes de Saúde da Família
GINA	Iniciativa Global Nacional da Asma
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclica
Grupo OVA	Animais que receberam inalações com ovalbumina.
Grupo OVA-W	Animais que receberam inalações com ovoalbumina e tratamento com 1400W i.p.
Grupo OVA-NOR	Animais que receberam inalações com ovoalbumina e receberam nor-NOHA no banho.
Grupo OVA-NOR-W	Animais que receberam inalações com ovoalbumina, tratamento com 1400W i.p.e nor-NOHA no banho.
Grupo SAL	Animais que receberam inalações com soro fisiológico 0,9%
GSF	Fator estimulador de colônia – granulócito
i.p.	Intra-peritoneal
IgE	Imunoglobulina E
IkB	Proteína inibitória
IL	Interleucina

iNANC	Componente inibitório do sistema não-adrenérgico não-colinérgico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISSAC	Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância
L-arginina	Aminoácido semi-essencial
L-NAME	L-NG-nitroarginina metil ester - falso substrato para todas as óxido nítrico sintases
LAR	Reação asmática tardia
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1 e MIP-1a	Citocinas pró-fibróticas pulmonares
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NaCl 0,9%	Soro fisiológico - SF
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NANC	Sistema não-adrenérgico não-colinérgico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear
N-hidrox-L-arginina	Intermediário da L-arginina
NLS	Sinal de localização nuclear
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
nor-NOHA	N ^ω -Hydroxi-nor-L-arginina- inibidor específico da arginase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO-	Peroxidonitrito
O₂⁻	Superóxido
OVA	Ovoalbumina
PBS	Solução salina tamponada
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandinas D2
PGE2	Prostaglandinas E2
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SF	Soro Fisiológico

SF	Soro Fisiológico
SOD	Supeóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
Strip	Fatia de tecido pulmonar
TAD	Domínio de transativação
TGF-beta	Fator Transformador do Crescimento-Beta
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases

RESUMO

Aristóteles L. Modulação da mecânica do tecido pulmonar periférico e da resposta do estresse oxidativo pela inibição da arginase e da iNOS em modelo experimental de inflamação crônica pulmonar [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. (108 páginas)

Introdução: A importância do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma tem sido recentemente enfatizada, particularmente nos pacientes com asma grave e de difícil controle. O óxido nítrico (NO) é um importante modulador da resposta contrátil, inflamatória e de remodelamento pulmonar que ocorrem na asma. Embora seu papel na modulação em vias aéreas proximais e distais já tenha sido estabelecido, seus efeitos no parênquima pulmonar foram pouco investigados. **Objetivos:** Avaliar se a inibição da arginase 2, por intermédio do tratamento com N ω -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), e da iNOS, por intermédio da administração de 1400W, pode modular a resposta constritora de parênquima distal, o estresse oxidativo, a expressão de iNOS, assim como a atividade da arginase, em modelo de inflamação alérgica crônica pulmonar em cobaias. **Métodos:** Os animais foram expostos a sete inalações com soro fisiológico ou com ovoalbumina em doses crescentes (1~5mg/ml- 4 semanas) e tratados com 1400W (2mg/Kg ip. diariamente) iniciando após a 7^a inalação e nor-NOHA (10 μ M - infusão no banho durante a avaliação da mecânica oscilatória), ou associação de 1400W + nor-NOHA (administrado conforme descrito anteriormente). Setenta e duas horas após a sétima inalação os animais foram anestesiados, exsanguinados e a foi realizada a avaliação da mecânica oscilatória do parênquima pulmonar, sendo obtidos os valores de resistência e elastância tecidual na condição basal e após desafio (0,1% de ovoalbumina). Em

seguida, os fragmentos de tecido pulmonar periférico foram fixados em solução de formolaldeído a 4%, por 48 horas. Depois de terminada a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4µm de espessura. Os cortes foram corados para Hematoxilina e Eosina e utilizando técnica de imunohistoquímica foram avaliados o número de células iNOS positivas, a expressão de PGF2α, do fator de transcrição NF-kB e de arginase 2 no septo alveolar, por intermédio de avaliação morfométrica. A expressão de arginase 2, NF-kB e PGF2α nos fragmentos de tecido pulmonar periférico foram avaliados em aumento 400X utilizando o programa Image-Pro Plus 4.5v *Image Analysis System* e os resultados foram expressos em porcentagem. Em relação ao número de células iNOS positivas nos fragmentos pulmonares, foi utilizada a técnica de contagem de pontos, determinada pelo número de pontos que coincidiam em células positivas em cada campo dividido pelo número de pontos que incidiam no tecido pulmonar, no aumento de 1000x. Foram analisados 10 campos por corte, selecionados de forma randômica. Os resultados foram expressos como células por unidade de área (10⁴µm²). Para a avaliação da atividade da arginase 2, foi utilizado o método descrito no kit da *BioAssay Systems* que utiliza um cromogênio, que forma um complexo corado com uréia, produzido na reação de arginase. A determinação da atividade da arginase 2 envolveu a medida da velocidade de reação, expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg). **Resultados:** Não houve alteração no percentual de estruturas (vasos, vias aéreas e tecido alveolar) no tecido pulmonar nos quatro grupos experimentais, sendo que mais de 90% de tecido do fragmento pulmonar foi constituído de alvéolos. Os animais que foram expostos à ovoalbumina apresentaram um aumento da resistência e da elastância tecidual

(após desafio antigênico), no número de células iNOS positivas, na percentagem de expressão de $\text{PGF2}\alpha$, arginase 2 e NF-kB no septo alveolar, assim como da atividade de arginase 2 comparativamente aos grupos controles ($p<0,001$). O tratamento com nor-NOHA ou 1400W isoladamente em animais expostos à ovoalbumina atenuou a resposta de elastância e resistência teciduais após desafio antigênico ($p<0,001$), o número de células iNOS positivas ($p<0,001$), na expressão de $\text{PGF2}\alpha$, de arginase 2 e NF-kB no septo alveolar ($p<0,001$). Porém a atividade da arginase 2 só foi reduzida nos grupos que foram tratados com nor-NOHA e na associação de 1400W e nor-NOHA ($p<0,05$). A associação de 1400W e nor-NOHA em animais expostos à ovoalbumina potencializou a atenuação da expressão $\text{PGF2}\alpha$ no septo alveolar ($p<0,001$). **Conclusões:** O presente estudo sugere que, neste modelo experimental de inflamação crônica pulmonar, a inibição da arginase tem papel importante na modulação das repostas constritoras e de estresse oxidativo no parênquima pulmonar distal. A associação da inibição da iNOS à da arginase 2 potencializa o controle da resposta de estresse oxidativo. Estas respostas são, pelo menos em parte, moduladas pela ativação de NF-kB. A inibição destas vias enzimáticas pode representar uma estratégia futura para o tratamento de pacientes com asma grave e de difícil controle.

Descritores: 1. Arginase 2. Inflamação alérgica crônica 3. Estresse oxidativo, 4. NF-kB, 5. iNOS.

SUMMARY

Aristóteles L. Modulation of peripheral lung tissue of mechanical and oxidative stress response by inhibiting arginase and iNOS in an experimental model of chronic pulmonary inflammation [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introduction: The importance of the lung parenchyma in the pathophysiology of asthma has recently been emphasized, particularly in patients with severe asthma and difficult to control. Nitric oxide (NO) is an important modulator of contractile response, lung inflammation and remodeling occurring in asthma. Although its role in the modulation proximal and distal airways tone control has already been established, its effects on the lung parenchyma were rarely investigated. **Aims:** To evaluate the inhibition of arginase 2, through treatment with Nω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) and / or iNOS, through the administration of 1400W, can modulate the constrictor response of distal parenchyma, oxidative stress, the expression of iNOS and the activity of arginase, in a model of chronic allergic lung inflammation in guinea pigs. **Methods:** The seven animals were exposed to inhaled saline or ovalbumin with increasing doses (1~5mg/ml-4 weeks) and treated with 1400W (2mg/kg ip daily) beginning after the 7th inhalation and nor-NOHA (10μM - infusion in the bath during the evaluation of mechanical oscillation), or combination of 1400W + nor-NOHA (administered as formerly). Seventy-two hours after the seventh inhalation the animals were anesthetized, and exsanguinated and it was performed evaluation was made of oscillatory mechanics of lung parenchyma, and obtained the values of tissue resistance and elastance at baseline and after challenge (0.1% ovalbumin). Then the peripheral lung tissue fragments were

fixed in formaldehyde 4% for 48 hours. After completion of fixation, the material was subjected to routine histological techniques with paraffin to obtain sections of 4µm thickness. The sections were stained with Hematoxylin and Eosin and by using immunohistochemical technique, we assessed the number of iNOS positive cells and expression of PGF2α, of the transcription factor NF-kB and arginase 2 in the alveolar septum, through morphometric analysis. The expression of arginase 2, NF-kB and PGF2α in peripheral lung tissue fragments were evaluated at 400X increase by Image - Pro Plus Image Analysis System 4.5v and the results were obtained as a ratio between the amount of expression of arginase 2, α NF-kB and PGF2α and are expressed as percentage. Regarding the content of iNOS in lung fragments, we used the technique of counting points, determined by the number of points coinciding in the positive cells in each field divided by the number of points that focused on lung tissue, using the increase of 1000x. Were increase of 10 fields analyzed per section, selected randomly. The results were expressed as cells per unit area (10⁴µm²). To assess the activity of arginase 2 we used the method bioassay described in the *kit Systems* using a chromogen which forms a colored complex with urea produced in the reaction of arginase. The determination of the activity of arginase 2 involved the measurement of reaction rate, expressed in terms of activity per milligram of protein (U/mg). **Results:** There were no changes in the percentages of structures (vessels, airways and alveolar tissue) lung tissue in four experimental groups, with more than 90% of the tissue fragment consisted of pulmonary alveoli. The animals that were exposed to ovalbumin, showed an increase in tissue resistance and elastance after antigen challenge, the number of iNOS positive cells, the of expression of PGF2α, of NF-kB and arginase 2 in

the alveolar septum well as in the activity of arginase 2, compared to control groups ($p < 0.001$). The treatment with nor-NOHA or 1400W alone in animals exposed to ovalbumin attenuated the tissue elastance and resistance after antigenic challenge ($p < 0.001$), the number of iNOS positive cells ($p < 0.001$), the expression of $\text{PGF2}\alpha$, arginase 2 and NF κ B in the alveolar septum ($p < 0.001$). However the activity of arginase 2 was reduced in only in the groups that were treated with nor-NOHA and the association of 1400W and nor-NOHA ($p < 0.05$). The combination of 1400W and nor-NOHA, in animals exposed to ovalbumin enhanced the attenuation of the expression of $\text{PGF2}\alpha$ in the alveolar septum ($p < 0.001$). **Conclusions:** The present study suggests that in this experimental model of chronic pulmonary inflammation, inhibition of arginase 2 plays an important role in the modulation of constrictor responses and oxidative stress in the distal lung parenchyma. The association of iNOS inhibition to the arginase 2 enhances the control of oxidative stress response. These responses are, at least in part, modulated by the activation of NF- κ B. The inhibition of these enzyme pathways may represent a future strategy for the treatment of patients with severe asthma and difficult to control.

Keywords: 1. Arginase 2. 3 chronic allergic inflammation. Oxidative stress, 4. NF- κ B, 5. iNOS

1

INTRODUÇÃO

1.1 ASMA BRÔNQUICA

Asma brônquica é considerada atualmente um problema de saúde pública que gera alto custo com medicações e internações de pacientes. (Souza-Machado et al., 2010). Além disso, como a incidência é alta, particularmente em faixas etárias economicamente ativas, o impacto sócio-econômico é grande em todas as comunidades ao redor do mundo (Souza-Machado et al., 2010).

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revisados em 2010, aproximadamente 235 milhões de pessoas têm diagnóstico de asma brônquica e 250.000 pessoas morrem por ano desta doença no mundo.

Considerando os dados divulgados pelo Ministério da Saúde (Base de Dados do Sistema Único de Saúde), em 2011, o Brasil apresentou avanços na assistência a pacientes com a doença atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). 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. A queda se deve, entre outros fatores, à ampliação do acesso a medicamentos pelo SUS e à atuação dos profissionais da Estratégia Saúde da Família, principal política da atenção básica do Ministério da Saúde, focada em ações de prevenção e promoção da saúde (Ministério da Saúde, 2011).

Além de expandir e ampliar a oferta de tratamento para a asma, o Ministério da Saúde por outro lado, vem investindo na atenção básica, ampliando o acesso a ações de informação, educação, prevenção e atendimento à população por meio das Equipes de Saúde da Família (ESF).

Tais medidas focam, principalmente, na prevenção a doenças crônicas, que é o caso da asma. OS recursos investidos na ESF aumentaram mais de cinco vezes, saltando de R\$ 1,8 bilhão, em 2003, para R\$ 9,6 bilhões, em 2010 (Ministério da Saúde, 2011).

A principal meta do tratamento da asma é a obtenção e manutenção do controle da doença. Um estudo multicêntrico, o *International Study for Asthma and Allergies in Childhood* (ISSAC), realizado na América Latina e abrangendo a faixa etária entre 13 e 14 anos, encontrou prevalência de 16% no Brasil (Asher et al., 1995).

Recentemente um estudo multicêntrico transversal, com estudos que utilizaram a metodologia do ISSAC na América do Sul, ainda demonstra um patamar elevado de asma neste continente. O objetivo desta revisão foi verificar a prevalência de asma e rinite na América do Sul e relatar as diferenças com outras regiões do mundo. O estudo ISSAC fase 1, envolveu crianças em idade escolar, 13-14 anos de idade (adolescentes) e 6-7 anos de idade (crianças) (Tabela 1). ISAAC fase 3, uma repetição da fase 1 após um intervalo de pelo menos cinco anos, examinou variações de tendências

temporais da asma na infância em todo o mundo (Chong Neto et al., 2012).

CONTINENTES	6-7anos	13-14anos
Oceania	20,39%	20,21%
América Latina	0,32%	0,07%
Norte e Leste Europa	0,26%	0,05%
África	0,16%	0,10%
América do Norte	0,12%	0,32%
Mediterrâneo Oriental	20,10%	0,79%
Ásia-Pacífico	+0,07%	20,06%
Subcontinente indiano	0,02%	0,06%

Tabela 1. Redução mundial na prevalência dos sintomas de asma em crianças de 6-7anos e 13-14anos (*Fonte:* Modificado de Chong Neto et al., 2012).

A GINA (*Global Initiative for Asthma*) chegou ao Brasil durante a campanha mundial “2010 – O Ano do Pulmão” afirmando-se como um dos membros mais ativos da Aliança Global contra Doenças Respiratórias Crônicas (GARD) liderada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A meta mundial da GINA é reduzir em 50%, até 2015, as hospitalizações por asma.

1.1.2. DEFINIÇÃO E ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

A fisiopatologia da asma brônquica e novas possibilidades terapêuticas têm sido foco de estudo de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, particularmente pela alta prevalência, morbidade e mortalidade dos pacientes asmáticos nas últimas décadas (GINA, 2011).

A asma é definida como *“uma doença inflamatória crônica de vias aéreas que são hiperresponsivas a diferentes alérgenos podendo levar a episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, dor torácica e tosse, particularmente a noite e pela manhã. Os episódios de crise asmática estão associados à obstrução variável do fluxo aéreo que geralmente é reversível espontaneamente ou com o tratamento específico. A obstrução das vias aéreas ocorre pelo processo inflamatório, pela deposição de muco e por broncoconstrição.”* (GINA, 2011).

A sensibilização parece ser o primeiro processo para o desenvolvimento da asma brônquica. Para tanto, as células apresentadoras de antígeno (macrófagos alveolares, células epiteliais e, particularmente, as células dendríticas) interagem com os linfócitos Th2 e desencadeiam a produção de anticorpos de classe IgE, que por sua vez, se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos. Após a sensibilização, um próximo contato com o antígeno induz a desgranulação mastocitária,

iniciando a resposta asmática imediata, onde diversas células liberam mediadores inflamatórios os quais causam contração da musculatura lisa das vias aéreas. Esta fase instala-se em pouco tempo, com pico de resposta ocorrendo em 10 a 20 minutos e esta resposta aguda costuma finalizar-se de 1 a 2 horas após a exposição ao antígeno (Cockroft et al., 1997; Durham et al., 1984).

A liberação dos mediadores inflamatórios é responsável pela migração de eosinófilos, linfócitos T e neutrófilos para as vias aéreas, que vão caracterizar o início da fase tardia da resposta asmática (Bousquet et al., 1990; Schuiling et al., 1998). Esta tem início de 3 a 6 horas após o contato com o antígeno e pode persistir por horas ou dias, caso não haja tratamento adequado. A inflamação contribui com a hiperresponsividade das vias aéreas, com conseqüente limitação ao fluxo aéreo, contração do músculo liso brônquico, edema de vias aéreas e aumento da produção de muco. Em modelos animais, particularmente em cobaias, parecem existir duas respostas asmáticas tardias, sendo a primeira em torno de 17 horas após o contato com o antígeno, e a segunda normalmente em 72 horas (Hutson et al., 1988).

Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos da asma brônquica envolvendo uma série de células inflamatórias e mediadores. As respostas alérgicas são predominantemente de classe Th2 e envolvem, principalmente, as citocinas IL-3, IL4, IL-5, IL-9 e IL-13, entre outros mediadores. Fonte: Modificado de GINA, 2005 .

O desencadeamento de várias respostas tardias pode levar ao remodelamento pulmonar e contribuir para que não ocorra reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas (Tiddens et al., 2000; Mauad et al., 2007). Diversos eventos são observados neste processo, como a hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa das vias aéreas (Ebina et al.,1993), aumento das glândulas mucosas, espessamento da membrana basal, aumento no número de células claras no epitélio das vias aéreas (Laitinen et al.,1993), alteração dos componentes da matriz extracelular, maior número de miofibroblastos com aumento na deposição de fibras colágenas (Roche et al.,1989), aumento no número de vasos

sanguíneos (Li;Wilson,1997) e alterações estruturais no parênquima pulmonar.

Mauad et al. (2011) demonstraram que ocorre diminuição do conteúdo do sistema elástico nas vias aéreas de pacientes asmáticos, sugerindo que este sistema tem importância no processo de remodelamento brônquico. Sabe-se ainda que diversos mediadores/moduladores inflamatórios, entre eles o óxido nítrico, participam do processo de fibrogênese, perpetuando a agressão tecidual e a formação de tecido cicatricial (Al-Muhsen et al., 2011; Prado et al., 2011).

Há alguns anos, vem sendo discutida a possibilidade de que a asma pode ser uma doença tanto de vias aéreas quanto de parênquima alveolar propriamente dito. Diversos autores já demonstraram a presença da inflamação e do remodelamento de parênquima pulmonar, tanto em humanos quanto em modelos experimentais nos quais ocorre um processo inflamatório crônico (Kraft et al.,1996; Mauad et al., 2004;Lanças et al., 2006; Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

Neste sentido, Kraft et al. (1996) mostraram, em biópsias de tecido pulmonar de pacientes asmáticos, que ocorre uma infiltração de eosinófilos e macrófagos em vias aéreas distais, mais especificamente em região de tecido alveolar. Utilizando modelos experimentais de inflamação crônica de vias aéreas, Lanças et al. (2006) demonstraram que ocorre um aumento na

responsividade específica e inespecífica do tecido pulmonar periférico de cobaias com inflamação crônica de vias aéreas, utilizando sistema de mecânica oscilatória. Além disso, estes autores ainda observaram maior quantidade de fibras colágenas e elásticas depositadas na parede dos alvéolos de animais sensibilizados quando comparado ao controle.

Assim, o tecido pulmonar periférico parece ter um papel importante na resistência pulmonar total, alertando para a possibilidade da participação também do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que provavelmente altera o conceito e principalmente as formas de pensar o tratamento da doença (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009). Portanto, fatias de tecido pulmonar (“*strips*”) analisadas por intermédio de mecânica oscilatória, têm sido usadas como instrumento capaz de elucidar as propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão.

Apesar de, estas evidências demonstrarem claramente a importância do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, poucos estudos avaliaram os efeitos de mediadores inflamatórios nas alterações periféricas pulmonares (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

1.1.3. ASPECTOS CLÍNICOS

Recomenda-se que o manejo dos pacientes com asma seja baseado

em alcançar o controle das manifestações clínicas da doença e manter este controle por períodos prolongados (GINA, 2011). A avaliação do controle da asma deve incluir não somente as manifestações clínicas, mas também no controle dos fatores de risco em pacientes com exacerbações, declínio acelerado da função pulmonar e efeitos colaterais do tratamento (Quadro 1)

NÍVEIS DE CONTROLE DA ASMA			
A) AVALIAÇÃO DO CONTROLE CLÍNICO			
CARACTERÍSTICAS	CONTROLADA	PARCIALMENTE CONTROLADA	NÃO CONTROLADA
SÍNTOMAS DIÁRIOS	Nenhum ou 2x ou menos/semana	Mais que 2x/semana	3 características ou mais da parcialmente controlada
LIMITAÇÕES DE ATIVIDADES	Nenhuma	Nenhuma	
SINTOMAS NOTURNOS	Nenhum	Nenhum	
NECESSIDADE DE ALÍVIO/EMERGÊNCIA DE TRATAMENTO	Nenhum ou 2x ou menos/semana	Mais que 2x/semana	
FUNÇÃO PULMONAR (PEF ou FEV1)	Normal	<80% previsto	
B) AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO (exacerbações, instabilidade, rápido declínio da função pulmonar, efeitos secundários)			
Fatores que estão associados ao aumento de eventos adversos no futuro incluem: Ineficiência do controle clínico, frequentes exacerbações no último ano, aumento de admissões nos centros especializados, menor FEV1, exposição a cigarros, aumento dose de medicações.			

Quadro 1. Características clínicas da asma controlada, parcialmente controlada e não controlada (*Fonte:* Modificado de GINA, 2011).

A maioria da população asmática tem uma doença controlada ou

parcialmente controlada, com pouco impacto na sua vida cotidiana, no entanto um pequeno grupo de doentes com asma, apesar de acompanhamento especializado e tratamento contínuo adequado, continua a ter sintomas persistentes sendo responsáveis pela maioria das hospitalizações, idas a serviços de urgência e absenteísmo por asma (Fonseca; Botelho, 2006).

A gravidade da asma pode ser influenciado tanto por genes específicos que podem levar a um declínio na função pulmonar, ou por interações exógenas, que leva o indivíduo a redução na capacidade de resposta ou ser resistente a uma forma específica de tratamento da asma, como corticosteróides (Bleecker, 2008; GINA, 2011).

Botelho, Fonseca (2006) e Ponte et al. (2011) verificaram que pacientes com asma grave têm maior risco de morte. Em alguns países, estratégias governamentais para o melhor tratamento da asma reduziram a taxa de internação hospitalar, o número de crises de asma quase fatais e a mortalidade por asma (Souza-Machado et al., 2010).

Os custos referentes a hospitalização de pacientes com asma grave giram em torno de 10.000 euros por ano (Breekveldt-Postma et al., 2008). No Brasil, os custos relacionados à hospitalização por asma são bem menores que em países europeus, mas mesmo assim, pacientes com asma

não controlada custam até oito vezes mais ao sistema de saúde pública do governo federal do que os pacientes controlados (Santos et al., 2007).

Na asma grave a estratégia terapêutica para o controle adequado do paciente é possível a partir da utilização de medicamentos inalatórios preventivos. Há pouco tempo no Brasil, isso era inacessível à maioria da população pelo seu custo. Nos últimos dez anos, o governo federal vem ampliando significativamente a oferta de medicamentos para o tratamento da asma, assim como investiu na atenção básica, ampliando o acesso a ações de informação, educação, prevenção e atendimento à população por meio das Equipes de Saúde da Família (Ministério da Saúde, 2011).

Assim se compreende a atenção crescente sobre este grupo de doentes que, são afinal aqueles que mais podem necessitar e se beneficiar de acompanhamento e intervenções terapêuticas especializadas.

1.2 IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO

As propriedades mecânicas do parênquima pulmonar têm sido consideradas como um dos determinantes da alteração funcional na asma (Lanças et al., 2006; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009; Romero et al., 2001). Apesar de que grande parte do aumento da resistência de vias aéreas possa ser atribuída à obstrução de vias aéreas, alguns estudos têm sugerido que a resposta inflamatória e funcional que

ocorre na asma não está restrita apenas às vias aéreas, mas também ao parênquima pulmonar isto é, ao tecido pulmonar periférico (Bachofen et al., 1968; Angeli et al., 2008, Starling et al., 2009). A resistência do tecido pulmonar (Rt) tem um importante papel na resistência pulmonar total (RL) e aumenta significativamente em resposta a estímulos primariamente broncoconstritores (Cortijo et al., 1984).

Ainda não está totalmente estabelecido o local da resposta contrátil do parênquima pulmonar alveolado. Os mecanismos que podem estar potencialmente envolvidos nesta resposta são: a resposta contrátil de miofibroblastos ou de outras células intersticiais, alterações na interface ar-líquido alveolar, alterações da matriz extracelular, contração de células musculares lisas ao nível de ductos alveolares, pequenas vias aéreas ou vasos presentes no tecido pulmonar periférico (Lai et al., 1994).

Uma revisão realizada por Kraft et al. (1999), em animais e humanos demonstrou a importância da participação das vias aéreas distais (diâmetro < 2 mm) e parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma. Os pesquisadores mostraram que pacientes que morreram de asma apresentam importantes alterações no parênquima pulmonar. Mauad et al. (2004) estudaram 15 pacientes que foram a óbito por crises asmáticas. No estudo de autópsia os autores observaram que há diminuição da quantidade de fibras elásticas em pequenas vias aéreas, que são essenciais para a manutenção do recolhimento elástico pulmonar e que este fator poderia

contribuir para o desfecho fatal observado nestes pacientes.

Para a avaliação das propriedades mecânicas e da resposta farmacológica da periferia do pulmão têm se estudado os fragmentos do parênquima pulmonar. Estudos realizados com fragmentos de parênquima pulmonar periférico de cobaias e ratos apontam para uma característica de contração e relaxamento do tecido periférico dependendo da droga utilizada, o que sugere a participação do parênquima na resistência pulmonar total. (Ludwig et al., 1997).

Romero et al. (2001) demonstraram que a broncoconstrição induzia mudanças estruturais na matriz do tecido conectivo em fragmentos pulmonares. Tanaka;Ludwig (1999) compararam as propriedades mecânicas de fragmentos pulmonares periféricos de cobaias com diferentes idades. Demonstraram que o parênquima pulmonar de cobaias jovens apresentava baixa histerese e maior plasticidade que o observado em animais adultos.

Dolhnikoff et al. (1999) verificaram que o parênquima pulmonar humano responde a estimulação contrátil por acetilcolina com aumento da resistência e da elastância do tecido pulmonar periférico. Os autores notaram que não houve diferença na resposta contrátil entre os fragmentos pulmonares com e sem vias aéreas (detectadas por análise morfométrica). Estes dados sugerem que a resposta contrátil encontrada decorra de alterações do parênquima pulmonar. Salerno et al. (1995) demonstraram

que quanto mais proximais forem os fragmentos, maior seria a influência da parede brônquica na determinação da resposta mecânica.

Além disso, outros autores avaliaram em modelo animal de inflamação alérgica crônica a importância do parênquima pulmonar (Prado et al., 2006; Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

Lanças et al., (2006) estudaram a resposta tardia e imediata em modelo de asma em cobaias utilizando a avaliação por mecânica oscilatória de fragmentos de tecido pulmonar periférico. Os autores demonstraram que neste compartimento pulmonar é possível detectar-se resposta imediata e duas respostas tardias após o desafio com o antígeno e que estes achados se correlacionaram à intensidade da resposta inflamatória eosinofílica e deposição de colágeno.

Xisto et al., (2005) estudaram a mecânica e o remodelamento de vias aéreas e de parênquima pulmonar em modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos. Os autores mostraram que a inflamação eosinofílica não está somente presente em vias aéreas, mas também em parênquima pulmonar, concluindo que a exposição prolongada a alérgenos induz o remodelamento não só de vias aéreas, mas também de parênquima pulmonar.

Nakashima et al. (2008) mostraram que, em cobaias com inflamação

alérgica crônica, a indução de tolerância oral atenuou as respostas de mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico, bem como a resposta inflamatória eosinofílica.

É importante considerar que muitos dos dispositivos utilizados para administração de corticóides inalatórios geram partículas que não chegam efetivamente às vias aéreas distais e parênquima pulmonar. As formulações mais novas de corticosteróides inalados, que usam o hidroflurorano, tem maior deposição distal, sendo que a taxa de deposição pulmonar pode chegar a 60 %, enquanto 30% se depositam na orofaringe, podendo contribuir a longo prazo para a maior efetividade do tratamento destes (Kraft et al., 2007).

1.3. ÓXIDO NÍTRICO E ASMA

A molécula de óxido nítrico (NO) durante muitos anos foi conhecida como um nocivo poluente ambiental proveniente da fumaça de cigarros, (Norman et al., 1965). É gerada pela exaustão de combustíveis de veículos automotores, destruindo a camada de ozônio e causando chuva ácida (Cullota et al., 1992). No entanto, a partir dos anos 80 pesquisadores demonstraram que o NO é uma molécula essencial na fisiologia do corpo humano (Bell., 2004). O NO tornou-se biologicamente conhecido em 1998, quando três americanos, Louis J. Ignarro, Robert Furchgott e Ferid Murad da

Escola de Medicina da Universidade do Texas em Houston foram honrados com o Prêmio Nobel devido à publicação de vários trabalhos com o intuito de esclarecer sua função, via de formação no organismo e sua atuação na fisiopatologia de algumas doenças. Hoje, o papel do óxido nítrico já está mais detalhadamente estabelecido (Bell, 2004).

O NO tem sido bem descrito como um neurotransmissor endógeno não adrenérgico não colinérgico (NANC) em vias aéreas responsáveis pela modulação do tônus brônquico (Barnes;Belvisi, 1993), tônus vascular (Alving et al.,1992) e exudação plasmática (Kuo et al.,1992) tanto em modelos animais quanto em humanos (Prado et al., 2010).

Cabe ressaltar que os componentes do sistema nervoso autônomo pulmonar são: o adrenérgico, o colinérgico e o sistema não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) O sistema NANC é composto de um conjunto de fibras sensitivas não-mielinizadas, cujos processos terminais atingem as células epiteliais, vasos, musculatura lisa peribrônquica e glândulas mucosas. O sistema NANC apresenta dois grandes grupos: um componente inibitório (i-NANC) que causa broncodilatação e outro excitatório (e-NANC) cuja estimulação resulta em broncoconstrição (Moncada et al., 1991; Ricciardolo et al., 2004).

O óxido nítrico é gerado durante a conversão do aminoácido L-

arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), utilizando o NG-hidroxi-L-arginina como um intermediário, que por sua vez, inibe a atividade arginase (Maarsingh et al., 2008). A L-citrulina pode ser convertida a partir do argininosuccinato em L-arginina e arginase, sendo capaz de metabolizar a L-arginina em L-ornitina (Ricciardolo et al., 2004).

Considerando a enzima óxido nítrico sintase, sabe-se que existem três diferentes isoformas, sendo duas delas constitutivas e uma induzida: a isoforma neuronal ou tipo I (nNOS), a isoforma induzida ou tipo II (iNOS) e a isoforma endotelial ou tipo 3 (eNOS) (Redington, 2006; Racke; Warnken, 2010)

Todas as isoformas são flavoproteínas que tem tetrahydrobiopterina, heme, e uma área que é homóloga ao citocromo P450. Agem como dioxigenases usando uma molécula de oxigênio e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para transformar o L-arginina em L-citrulina e liberação do óxido nítrico. O tetrahydrobiopterina (BH4) é o co-fator principal para todas isoformas de óxido nítrico sintases, e na sua ausência, estas enzimas podem produzir superóxido, em vez de óxido nítrico (Guzik et al., 2003).

O NO parece atuar em vários mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam as alterações funcionais e histopatológicas encontradas em

pacientes asmáticos, sendo que a sua contribuição depende principalmente da enzima pela qual foi produzido. As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas, e estão presentes normalmente em situações fisiológicas. Além disso, são enzimas cálcio-dependente e capazes de produzir baixas quantidades de óxido nítrico. No entanto, alguns autores encontraram aumento destas isoformas em situações inflamatórias, tais como a asma (De Sanctis et al., 1997; Kobayashi et al., 2006).

A eNOS foi descoberta pela primeira vez em células endoteliais (Lamas et al., 1992) e o óxido nítrico formado por esta isoforma é responsável por manutenção do tônus vascular e impedir a baixa vascular parede adesão de leucócitos e plaquetas (Ignarro, 2002). A isoforma nNOS está presente principalmente nos neurônios e nervos (Vizzard et al., 1995), atuando como um mediador do iNANC (Barnes et al., 1998). No entanto, também foi encontrado, nas células musculares lisas das vias aéreas, sendo portanto responsável pelo relaxamento da musculatura lisa brônquica (Patel et al., 1999).

O lipopolissacarídeo (LPS) e várias citocinas aumentam o transporte da L-arginina, induzindo a produção de NO tanto pela isoforma induzida (iNOS), como pela atividade da arginase (Prado et al., 2011). A isoforma induzida está presente principalmente em situações patológicas e sua estimulação produz grandes quantidades de óxido nítrico. A presença desta

isoforma foi demonstrada inicialmente em macrófagos (Iyengar et al., 1987). No entanto, sabe-se que pode atuar em diferentes tipos de células, incluindo células epiteliais (Meng et al., 2000), neutrófilos (Iyengar et al., 1987) eosinófilos (Cerchiaro et al., 2001; Prado et al., 2005) e células mononucleares (Prado et al., 2005).

A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS pode resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th2, contribuindo para a fisiopatologia da asma (Riccardolo et al., 2003; Prado et al., 2005; Prado et al., 2006).

A produção de NO pode ser inibida pelo bloqueio das enzimas NOS, sendo, portanto estes inibidores de importância fundamental na avaliação do papel do NO na fisiopatogenia de diversas doenças (Moncada; Higgs, 2003).

Durante muitos anos a aminoguanidina foi considerada um inibidor específico de iNOS; (Baddedge et al., 1993). Contudo Garvey et al. (1997) demonstraram que o *N*-[3-(amino-metil) benzil] Acetamidina (1400W) apresenta alta seletividade na inibição de iNOS quando comparadas as demais isoformas, sendo este 5000 vezes mais eficiente que eNOS e 200 vezes mais eficiente que nNOS e que sua toxicidade está relacionada ao uso de doses elevadas.

A inibição farmacológica seletiva da iNOS pelo 1400W tem sido largamente estudada nos últimos anos (Baddedge et al., 1993; Garvey et al., 1997; Kobayashi et al., 2006; Tian et al., 2010). Neste sentido, Starling et al. (2009) demonstraram que o tratamento com 1400W atenuou a respostas de mecânica pulmonar, a infiltração eosinofílica, a expressão de iNOS, de isoprostano PGF2 α e o conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar em cobaias com inflamação alérgica crônica.

Examinando a contribuição da iNOS para a disfunção endotelial, Tian et al. (2010) demonstraram que o tratamento com o 1400W aumentou a vasodilatação em ratos idosos, e que este mecanismo foi relacionado com atenuação de formação de peroxinitrito. Este estudo sugere que a inibição da iNOS pode reduzir a incidência de doenças cardiovasculares.

Rus et al. (2010) estudando os efeitos do 1400W no pulmão de ratos submetidos à hipóxia / reoxigenação com ou sem tratamento, demonstraram que a administração de 1400W reduziu os níveis de NO em todos os grupos experimentais. Além disso, foram reduzidos a peroxidação lipídica, a porcentagem de células em apoptose e a expressão de nitrados no período pós-hipóxia tardio. Este estudo revelou que a iNOS pode exercer um efeito negativo sobre este órgão durante a hipóxia.

Recentemente, Prado et al. (2011), observaram em modelo experimental de inflamação alérgica crônica pulmonar em cobaias, que a

inibição da iNOS pelo 1400W, reduziu o remodelamento vascular brônquico extracelular, particularmente controlando a deposição de fibras colágenas e elásticas nos vasos, sugerindo que a inibição da iNOS neste modelo, tem um importante papel na modulação dos efeitos do remodelamento vascular.

1.4 COMPLEXO ÓXIDO NÍTRICO-ARGINASE

Classicamente, a arginase é a enzima que atua no ciclo hepático da uréia. No entanto, já foi observada em outras células do organismo que não expressam um ciclo completo da uréia, incluindo o pulmão (Que et al., 1998; Meurs et al., 2003).

Duas formas distintas de arginase foram identificadas em mamíferos, as quais são codificadas por diferentes genes e diferem em relação a sua distribuição tecidual, localização celular e modo de regulação (Wu e Morris, 1998).

A arginase tipo 1 é uma enzima citosólica, expressa principalmente no fígado e de forma limitada em outros tecidos, enquanto que arginase tipo 2 é uma enzima mitocondrial, expressa principalmente em tecidos extra-hepáticos (Wu; Morris, 1998).

Já no início dos anos oitenta, o aumento da atividade da arginase foi

encontrada no escarro de pacientes asmáticos (Kochanski et al., 1980). O aumento da expressão de arginase 1 nas vias aéreas de pacientes asmáticos foi descrita pela primeira vez por Zimmermann et al. (2003). Os autores encontraram aumento do número de células que expressavam arginase 1, presumivelmente macrófagos, no lavado bronco-alveolar destes pacientes (Zimmermann et al., 2003).

Além disso, Morris et al. (2004) demonstraram que, em pacientes asmáticos em crise, houve um aumento na atividade da arginase, enquanto que os níveis plasmáticos de L-arginina eram reduzidos. Na melhora dos sintomas destes pacientes, houve um declínio na atividade da arginase e um aumento nas concentrações de L-arginina (Morris et al., 2004).

Em modelos experimentais que usam diferentes antígenos em várias espécies e variedades o aumento da atividade e/ou expressão da arginase também tem sido demonstrado (Maarsingh et al., 2008a).

Neste sentido, alguns autores têm discutido que a arginase pode atuar em miofibroblastos, aumentando a produção de colágeno, contribuindo assim com o processo de remodelamento (Ricciardolo et al., 2003; Meurs et al., 2003). A expressão de arginase tipo 1 e tipo 2 foi detectada em fibroblastos do tecido conectivo peribrônquico (Que et al., 1998), assim como aumento da expressão da arginase 2 foi encontrada em vias aéreas distais

(Kenyon et al., 2008).

A expressão das arginases tipo 1 e 2 é regulada por uma gama de estímulos, incluindo citocinas derivadas dos linfócitos Th2, tais como IL- 4 e IL-10, IL-13, e PGE₂ (Zimmermann; Rothenberg, 2006). Uma vez que estes mediadores contribuem para o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas de asmáticos, acredita-se que a indução da atividade da arginase está envolvida na deficiência de NO e aumento da inflamação (Meurs et al., 2003; Maarsingh et al., 2009).

A disfunção do complexo óxido nítrico sintase-arginase parece exercer vários efeitos (Meurs et al., 2003), alterando aspectos relevantes da patologia da asma, particularmente no recrutamento de células inflamatórias (Leick-Maldonado et al., 2003; Prado et al., 2011), na hiperresponsividade das vias aéreas (Meurs et al., 2002), e, no processo de remodelamento (Ricciardolo, 2003; Ricciardolo et al., 2004; Prado et al., 2005a).

A Figura 2 esquematiza o complexo óxido nítrico e arginase. A L-arginina é catalisada tanto pela óxido nítrico, como pela arginase. A arginase produz L-ornitina e uréia que podem atuar em vários órgãos. Por outro lado, o óxido nítrico pode ser produzido por ambas óxido nítrico sintase: constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS), e tem um papel fisiopatológico importante por meio dos efeitos diretos ou indiretos sobre a produção de

```
graph TD
    LArg[L-ARGININA] --> ARG[ARGINASE]
    LArg --> cNOS[cNOS]
    LArg --> iNOS[iNOS]
    LArg --> NOS[NOS]
    LArg --> Cit[L-citrulina]
    LArg --> AS[Arginino succinato]
    Cit --> LArg
    AS --> LArg
    ARG --> LO[L-ornitina]
    ARG --> Cyt[Citocinas LPS]
    Cyt --> TAC[TAC]
    LO --> Efeitos[Efeitos fisiológicos e fisiopatológicos]
    cNOS <--> iNOS
    cNOS --> NGH[NG-hidroxi-L-arginina]
    iNOS --> NGH
    NGH --> NOS
    NOS --> NO[NO]
    NO --> Efeitos
    NO --> RSNO[R-SNO]
    NO --> Iso[Isoprostano]
    RSNO --> Efeitos
    Iso --> Efeitos
```

Como a L-arginina é o substrato comum tanto para a enzima óxido nítrico sintase quanto para a arginase, o bloqueio de uma destas vias enzimáticas, pode afetar, através da competição de substrato, a atividade da outra (Meurs et al., 2002; Ricciardolo et al., 2004). Sendo assim, recentemente, alguns autores sugeriram que o bloqueio da produção de NO por intermédio do falso substrato para todas as óxido nítrico sintases, o L-NAME possa ser uma ferramenta para o estudo indireto da participação da arginase em diversos processos fisiopatológicos (Meurs et al., 2002; Meurs

et al., 2003).

Alguns autores têm considerado que, parte dos efeitos do L-NAME dependem do aumento da atividade da arginase, podendo causar aumento de miofibroblastos, e da produção de colágeno, via produção de L- ornitina (Ricciardolo et al., 2003; Meurs et al., 2003). Angeli et al. (2008), demonstraram em cobaias com inflamação pulmonar crônica, que a inibição da óxido nítrico sintase (NOS) pelo L-NAME, atenuou a mecânica do tecido pulmonar periférico, o conteúdo de fibras elásticas e de isoprostano PGF2 α nos septos alveolares. No entanto, este tratamento não afetou o número total de eosinófilos e a deposição de colágeno. Estes dados sugerem que o NO possa contribuir para a constrição do parênquima pulmonar distal e para a deposição de fibras elásticas neste modelo. Estes efeitos podem estar relacionados a ativação das NOS, da via do estresse oxidativo e de uma possível participação indireta da via arginase.

A eficácia da inibição da arginase tem sido estudado em diferentes modelos animais utilizando diversos inibidores específicos. (Maarsingh et al., 2008; Bratt et al., 2009; Maarsingh et al., 2009; North et al., 2009). O primeiro relato sobre o efeito de inibidores de arginase em cobaias com inflamação alérgica pulmonar foi descrito por Maarsingh et al.(2008). Nesses animais, o tratamento por via inalatória com o inibidor da arginase 2(S)-aminoborono-hexanoico ácido (ABH) reverteu a responsividade das vias aéreas proximais.

O efeito protetor dos inibidores de arginase foi também confirmado em um outro modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar em ratos, mostrando que o tratamento com nor-NOHA via intraperitoneal reduziu significativamente a responsividade das vias aéreas à metacolina após o desafio alérgico (Bratt et al., 2009). Em cobaias com inflamação alérgica pulmonar, a responsividade das vias aéreas proximais também foi reduzida após o tratamento com nor-NOHA (Maarsingh et al., 2009).

Além disso, o inibidor específico da arginase, S-(2-boronoetil)-L-cisteína (BEC), normalizou a responsividade das vias aéreas proximais, mas não a de vias aéreas periféricas de camundongos com inflamação alérgica pulmonar (North et al., 2009). No mesmo modelo animal, o tratamento com S(2 –boronoetil)-L-cisteína (BEC) não só normalizou a responsividade das vias aéreas proximais, mas também das distais (North et al., 2009).

Neste sentido, os inibidores de arginase podem ser uma estratégia terapêutica na asma alérgica, uma vez que estes inibidores tem propriedades anti-inflamatórias e interfere no desenvolvimento da responsividade das vias aéreas.

1.5 ÓXIDO NÍTRICO E O ESTRESSE OXIDATIVO

O óxido nítrico possui um elétron ímpar, tornando-o um radical livre

que reage com outras moléculas como o oxigênio (O_2), radicais superóxido (O_2^-) ou metais de transição, formando os compostos reativos nitrogenados, que exercem funções fisiológicas e atuam na destruição de microorganismos (Ricciardolo et al., 2003).

Os radicais livres de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila) podem ser formados após ativação de várias células inflamatórias, por exemplo, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos. Quando as células das vias aéreas e os tecidos são expostos a poluentes ambientais, infecções, reações inflamatórias exacerbadas ou mesmo em situações nas quais os sistemas antioxidantes do organismo estão diminuídos, ocorre o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são responsáveis por vários efeitos deletérios nas vias aéreas, induzindo diversas condições patológicas (Wood et al., 2003; Ricciardolo et al., 2004).

Quando ocorre exposição a estas situações, as células inflamatórias e as células residentes nas vias aéreas geram superóxido (O_2^-) por meio da ativação de NADPH oxidase ou formam altas quantidades de óxido nítrico por aumento da expressão da iNOS. Assim, na presença de radicais livres de oxigênio, o NO reage com o superóxido, levando a uma maior produção de peroxidonitrito ($ONOO^-$) (Pryor; Squadrito, 1995) (Figura 2).

O peroxidonitrito é uma molécula altamente citotóxica e que reage

com espécies oxidantes, além de induzir hiperresponsividade nas vias aéreas em cobaias, inibir a produção do surfactante pulmonar, induzir a peroxidação lipídica, aumentar a permeabilidade vascular e causar danos às células epiteliais pulmonares (Groves, 1993; Zhang et al., 2000).

Além disso, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem causar danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios, proteínas e carboidratos, levando ao aumento das funções celulares e das reações inflamatórias. A produção destes radicais por neutrófilos parece estar aumentada em pacientes asmáticos (Wood et al., 2003; Sedwick et al., 1990).

O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação da membrana celular lipídica, que é responsável pela geração de uma série recentemente descoberta de compostos bioativos, análogos as prostaglandinas, conhecidas como isoprostanos (Morrow et al., 1990) (Figura 2).

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

As classes diferem em relação aos grupos funcionais nos anéis prostanos, podendo sofrer isomerização e gerar anéis E e D de isoprostanos, os quais são isômeros às prostaglandinas E2 (PGE₂) e prostaglandinas D2 (PGD₂), respectivamente (Famm e Morrow, 2003). Os isoprostanos E2/D2 são formados competitivamente com F2-isoprostano e estudos têm demonstrado que o 15-E2t-isoprostano, cujo anel E é análogo ao 15-F2t-isoprostano (8-iso-PGF-2 α), tem propriedades muito similares ao mesmo e é um ligante para os receptores tromboxane (Morrow, 2006). Além disso, tem sido notado que 15-E2t-isoprostano é também um ligante para vários receptores PGE₂ (PE). Os isoprostanos E2/D2 não são produtos terminais da via dos isoprostanos (Milne et al., 2008).

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

A atividade biológica do 8-iso-PGF-2 α tem sido investigada em vários sistemas demonstrando potente efeito vasoconstritor pré-glomerular em ratos (Takahashi et al., 1992), efeito vasoconstritor em pulmões isolados de coelhos (Banerjee et al., 1992) e efeitos tanto de vasoconstrição quanto de broncoconstrição em pulmões isolados de ratos (Kang et al., 1993).

Em humanos, F2-isoprostanos são detectáveis em todos os tecidos e

fluidos biológicos analisados, incluindo plasma, urina, lavado broncoalveolar, fluido cérebro-espinhal e bile, tanto quanto em vários outros tecidos (Milne et al., 2008). No pulmão, podemos detectar isoprostanos em células epiteliais, em macrófagos, no colágeno ao redor das vias aéreas e vasos e também no músculo liso de vias aéreas e vasos (Talati et al., 2006).

Os níveis normais de F2-isoprostanos têm sido descritos em humanos saudáveis (Famm, 2003; Milne et al., 2007). Este fato é de relevância por permitir a avaliação do papel dos efeitos dos oxidantes endógenos nas doenças, além de determinar o quanto intervenções terapêuticas relacionadas ao estresse oxidativo podem interferir na evolução fisiopatológica de várias doenças.

As evidências de que a inflamação, que é característica da asma, resulta em aumento do estresse oxidativo nas vias aéreas, veem se tornando cada vez maiores (Dworski et al., 2000). Particularmente, as células inflamatórias das vias aéreas como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos liberam quantidades aumentadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) em pacientes asmáticos (Calhoun et al., 1992; Sedwick et al., 1990). O aumento das ROS pode resultar em dano oxidativo direto da célula epitelial e perda celular, além de favorecer a hiperreatividade brônquica que também é característica da asma (Cortijo et al., 1999).

Desta forma, aspectos do sistema de defesa anti-oxidante, assim

como a peroxidação lipídica, são frequentemente utilizados como marcadores indiretos de estresse oxidativo na asma, uma vez que a peroxidação lipídica é de particular significância nesta doença (Wood et al., 2000).

Estudos têm demonstrado elevada peroxidação lipídica na asma, mensurada pelo $\text{PGF2}\alpha$, sendo que a sua concentração está aumentada em 3-4 vezes em asmáticos persistentes quando comparados aos indivíduos saudáveis (Wood et al., 2000). O aumento da concentração de isoprostanos no lavado broncoalveolar 24 horas após o desafio alérgeno fornece evidência direta de que os isoprostanos são produzidos no tecido das vias aéreas e podem contribuir com os efeitos físicos observados durante a resposta tardia da asma (Milne et al., 2008).

O NO também pode ser convertido em nitrato o qual pode oxidar proteínas. Isto pode ocorrer por intermédio da nitração da tirosina, em uma reação catalizada pela peroxidase eosinofílica (Wu e Morris, 1999). Elevados níveis de nitrotirosina foram observados em asmáticos (Hanazawa et al., 2000). Quantidades excessivas de ROS e RNS, que são produzidas pelos asmáticos podem exceder as defesas antioxidantes e causar estresse oxidativo (Hanazawa et al., 2000).

O estresse oxidativo tem papel importante na fisiopatologia da asma, e um método para quantificar a injúria oxidativa é a mensuração da

peroxidação lipídica, podendo levar a muitos efeitos prejudiciais na função de vias aéreas, incluindo a contração da musculatura lisa, indução da hiperresponsividade de vias aéreas, hipersecreção brônquica, lesão epitelial e exsudação vascular (Milne et al., 2007). Além disso, ROS pode induzir a produção de citocinas e quimiocinas por intermédio da produção do fator nuclear NF- κ B, em células epiteliais brônquicas (Biagioli et al., 1999).

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

O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50 (Chen et al., 1999). O termo NF κ B designa a combinação p50/RelA. Além dessas, outras subunidades foram descritas, tais como a c-Rel, RelB, e p52, sendo provável que diferentes tipos de combinações sejam capazes de ativar diferentes genes ou ainda bloquear a transcrição do p50/RelA. As subunidades p50 e p52, sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente, formam homodímeros inibitórios da transcrição, pois ligam-se a regiões promotoras sem exercer atividade, bloqueando a interação desses genes com o dímero ativo p50/RelA (Kopp et al., 1995).

No entanto, a família do NF-kB consiste de cinco subunidades, caracterizada por conter uma porção N – terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – *Rel homology domain*), a qual se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra denominada de domínio de dimerização. Nesta última, encontra-se um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal difere entre cada subunidade, sendo que p65, c-Rel e RelB contém um domínio de transativação (TAD), necessária para iniciar a atividade transcricional (Figura 4)

O fator de transcrição NF-kB é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados (Xiao, 2004). Essa superioridade deve-se aos variados estímulos que o ativam, tais como: neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, vírus e bactérias, óxido nítrico sintase induzida e a ciclooxigenase tipo 2 (O`Neil, 1997) (Figura 4).

Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF-kB. Quando não estimulado, o fator NF-kB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o IκB. Esse complexo impede a translocação do NF-kB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do IκB (Figura 3) são necessárias para que ocorra a

translocação (Tripathi e Aggarwal, 2006).

Figura 3. Esquema representativo dos estímulos que ativam as ações do NF-kB (flecha contínua) e fenômenos nos quais a ativação do NF-kB podem estar envolvida flecha pontilhada. (Fonte: Modificado de O'Neil, 1997).

Figura 4. Esquema representativo demonstrando a translocação do NF-κB para o núcleo. (Fonte: Modificado de Xiao, 2004).

1.6 JUSTIFICATIVA

Apesar de representarem uma minoria, pacientes com asma grave causam o maior impacto em termos econômicos e de uso de recursos médicos e hospitalares relacionados ao cuidado dos asmáticos (Fonseca; Botelho, 2006; GINA, 2011). Na maioria dos indivíduos asmáticos, o tratamento com corticosteróides inalados diminui a inflamação, a obstrução e a hiperresponsividade das vias aéreas (Bleecker, 2008). No entanto, pacientes com asma grave podem não apresentar reversibilidade total dos sintomas, mesmo com o uso regular de corticosteróide inalatório

associado aos broncodilatores como beta dois agonista ou aos antileucotrienos. Estes pacientes cursam com limitação de atividades diárias, pior qualidade de vida e maior risco de exacerbações graves o que aumenta o risco de mortalidade por asma (Mauad et al., 2008; Ponte et al., 2011).

Os estudos atuais em curso e os cuidados especializados contribuirão para melhorar a identificação e caracterização destes doentes, visando diagnóstico, acompanhamento e tratamento. Neste sentido, se compreende a necessidade de buscar novas medidas terapêuticas para o controle da doença nesses pacientes.

Vários autores têm utilizado fatias de tecido pulmonar periférico para avaliação do papel do parênquima na inflamação pulmonar obstrutiva crônica (Dolhnikoff et al., 1999; Prado et al., 2005; Xisto et al., 2005; Lanças et al., 2006; Prado et al., 2006; Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009). Assim, fatias de tecido pulmonar ("*strips*") analisadas por intermédio de mecânica oscilatória, têm sido usadas como instrumento capaz de elucidar as propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão tanto em humanos como em modelos animais (Lanças et al., 2006; Kraft, 2007). Acredita-se alterações das pequenas vias aéreas possam contribuir significativamente para o comprometimento funcional na asma, especialmente nos pacientes gravemente acometidos (Johannes et al., 2000; Mauad et al., 1999).

Demonstramos recentemente que o tratamento crônico com L-NAME e 1400W interfere nas respostas de mecânica oscilatória pulmonar, infiltração eosinofílica, expressão de iNOS e nNOS, estresse oxidativo e conteúdo de fibras elásticas em cobaias com inflamação crônica de vias aéreas, sugerindo que o NO, e provavelmente a arginase, estão envolvidos nas alterações de parênquima pulmonar presentes na asma (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009). Como a L-arginina é o substrato comum tanto para NOS quanto para a arginase, o bloqueio de uma destas vias enzimáticas pode modular indiretamente a atividade da outra (Meurs et al., 2002; Ricciardolo et al., 2004).

Considerando os dados acima, especula-se que parte dos resultados anteriores podem ser atribuídos tanto à deficiência da produção de NO, quanto à estimulação da via da arginase devido a uma maior disponibilidade de substrato. Assim sendo, no presente estudo investigamos os efeitos do tratamento com um inibidor específico da arginase (N ω -hidroxi-nor-L-arginina- nor-NOHA) na mecânica oscilatória e respostas ao estresse oxidativo do tecido pulmonar distal em um modelo bem estabelecido de inflamação pulmonar alérgica crônica.

2

OBJETIVOS

Neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias, nossos objetivos foram avaliar, no tecido pulmonar periférico os efeitos da inibição da arginase e da iNOS isoladamente e em associação, caracterizando os seguintes parâmetros:

- A. A mecânica oscilatória do tecido pulmonar periférico.
- B. A ativação da via do estresse oxidativo, por intermédio da avaliação da expressão de $\text{PGF2}\alpha$ e de células iNOS positivas.
- C. A expressão do fator de transcrição NFkB..
- D. A avaliação da expressão e atividade de arginase 2.

3

**MATERIAIS
E MÉTODO**

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo número 0534/06).

3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS:

Os animais foram divididos nos seguintes grupos (conforme o tipo de inalação e tratamento recebido):

- A. Inalações com solução salina estéril 0,9% (grupo SAL); (n=6);
- B. Inalações com solução de ovoalbumina (grupo OVA); (n=6);
- C. Inalações com solução de ovalbumina e tratamento com nor-NOHA no banho (grupo OVA-NOR); (n=6);
- D. Inalações com ovalbumina e tratamento com 1400W (ip) (grupo OVA-W); (n=6);
- E. Inalações com solução de ovalbumina e 1400W (ip) e nor-NOHA no banho (grupo OVA-NOR-W); (n=6);

Utilizamos para este protocolo 30 cobaias, do sexo masculino, da linhagem Hartley, com peso corporal variável entre 300 a 350g, sendo mantidas, sob alimento e água *ad libitum*, no biotério conjunto de manutenção dos Laboratórios de Investigação Médica (LIM) 20 e 05, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído. As cobaias eram

provenientes da empresa MEDLAB Produtos Diagnósticos LTDA (São Paulo, Brasil). Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório”, publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985), sendo que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia.

Foram estudados 35 animais, sendo perdidos 3 animais durante as inalações com ovalbumina e 2 que apresentaram lesões pulmonares, não relacionadas a indução de sensibilização, sendo excluídos do protocolo.

3.2. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

Os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US-1000, ICEL, Brasil). Foram submetidas à inalação com aerossol de ovoalbumina diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) com concentrações crescentes de ovoalbumina (1~5mg/dL) por 15 minutos ou até o aparecimento de sinais de desconforto respiratório como tosse, tiragem intercostal, coriza intensa e /ou cianose. O protocolo de inalação foi repetido duas vezes por semana durante um período de quatro semanas (Figura 5). O aumento crescente nas concentrações de ovoalbumina tinha o intuito de evitar a ocorrência de tolerância (Paré et al., 1979). Os animais controle foram submetidos à

exposição de aerossol de solução de soro fisiológico a 0,9%, seguindo o mesmo protocolo descrito acima (Tibério et al., 1997, Leick-Maldonado et al., 2002). Após 72 horas da sétima inalação, todos os animais foram anestesiados, exsanguinados, os pulmões foram removidos e submetidos à avaliação da mecânica oscilatória pulmonar.

Figura 5. Esquema do protocolo de sensibilização e administração do tratamento utilizado. As cobaias foram submetidas a inalações, duas vezes por semana, uma a uma, com doses crescentes de ovoalbumina ou soro fisiológico (NaCl 0,9%). Ao todo, foram realizadas sete inalações, sendo a última 72 horas antes da avaliação da mecânica pulmonar. O tratamento com 1400W teve início 30 minutos antes da 7ª inalação (após sensibilização) e foi administrado até o dia da avaliação da mecânica oscilatória do tecido pulmonar.

3.3. TRATAMENTO CRÔNICO COM 1400W

O 1400W (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EUA), que é potente e específico inibidor seletivo da iNOS, foi utilizado na dose de 2mg/kg/animal/dia/ip, durante quatro dias (Grupo OVA-W) com início 30 minutos antes da sétima inalação de qualquer ovalbumina ou soro fisiológico. Esta abordagem foi escolhida com base em dados anteriores (Garvey et al., 1997; Prado et al., 2006). Uma vez que altas doses de 1400W (50 mg/ kg ip) podem causar efeitos tóxicos, optamos por uma dose mais baixa. A eficácia terapêutica desta dose já foi demonstrada previamente em modelos experimentais (Garvey et al., 1997; Prado et al., 2006). Os animais controles receberam o mesmo volume de i.p. de soro fisiológico.

3.4. ADMINISTRAÇÃO DE NOR-NOHA

O nor-NOHA (N^ω-hidroxi-nor-L-arginina) é considerado um dos mais potentes inibidores de arginase, como descrito por Meurs et al. (2002). Após a coleta dos valores basais de resistência e elastância teciduais, nor-NOHA (10μM) foi adicionado ao banho de *Krebs*.

3.5. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE MECÂNICA OSCILATÓRIA DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO - OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO TECIDO

As fatias de tecido pulmonar periférico de cobaias, submetidas ao protocolo de sensibilização descrito previamente, foram obtidas da região subpleural medindo aproximadamente 10mm x 2mm x 2mm e foram mantidas em solução orgânica de *Krebs*, borbulhada continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio) em um pH de 7,40, após terem sido pesadas e seu comprimento de repouso (L₀) medido.

Cada uma das pontas do fragmento foi colada com cianocrilato a um pequeno clip metálico, fixado em um longo fio de aço de 0,5mm de diâmetro e o conjunto foi suspenso verticalmente e mergulhado num banho de 15ml de solução de *Krebs*, constantemente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, contido em um recipiente de vidro (Figura 6). De um lado, uma das pontas foi ligada a um transdutor de força (*modelo 400A; Cambridge Technologies, Watertown, MA, EUA*), que opera em torno de 10g, com uma resolução de 200µg e uma complacência de 1µg/g.

A outra ponta atravessou um orifício na parte inferior do recipiente, onde foi colocada uma gota de mercúrio, pois sua alta tensão superficial previne a perda ou o extravasamento da solução de *Krebs* contida no recipiente, e foi conectada a um braço oscilatório de controle de alterações

de comprimento (L) (*Modelo 300B; Cambridge Technologies*). Este braço é capaz de determinar ponto a ponto, a excursão de 8mm e a resolução de 1 μ m de comprimento, que conectado a um gerador (*Modelo 3030; BK Precision, Chicago, IL*), controla a frequência, amplitude e a forma de onda da oscilação

A tensão (T) é gerada por intermédio do movimento do parafuso, que efetua pequenos deslocamentos do transdutor de força. Os sinais de comprimento e força são captados e filtrados lentamente (*8-pole Bessel 902LPF; Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA*) com uma frequência de 30Hz e feita a conversão da leitura analógica à digital por um conversor (*DT2801-A; Data Translation Inc, Marlborough, MA, EUA*) sendo então, gravados num programa de computador.

O tecido foi submetido a uma força de 2g por três vezes (“stress relaxation”) retornando para uma força de 1 a 2g, com oscilação sinusoidal de 2,5% do comprimento inicial e uma frequência de 1Hz. Após 50 minutos de estabilização (com trocas de *Krebs* a cada 15 minutos), foram obtidos os dados de mecânica do tecido sob condições basais (por 5 minutos) e após desafio com ovoalbumina a 0,1% no banho (por 10 minutos) para obtenção de uma resposta máxima. (24). Os valores de elastância (E_t) e resistência (R_t) do tecido foram estimados por intermédio da equação de movimento, descritas abaixo:

$$T = E\Delta l + R(\Delta l / \Delta t) + K \text{ (equação 1)}$$

onde T é tensão, l é comprimento, $\Delta l / \Delta t$ é a variação do comprimento por unidade de tempo e K é uma constante que reflete a tensão de repouso. Os resultados foram padronizados de acordo com o tamanho da fatia de tecido pulmonar periférico. A área seccional transversal não estressada (A_0) da fatia de tecido pulmonar periférico foi obtida pela fórmula:

$$A_0(\text{cm}^2) = W_0 / (p \times L_r) \text{ (equação 2)}$$

onde p é a densidade da massa do tecido tido como 1,06 g/cm³, W₀ é o peso úmido em gramas, e L_r é o comprimento em centímetros. Os valores de R_t e E_t foram multiplicados por L_r/A₀. Foi analisada a porcentagem de aumento da resistência (%R_t) e elastância (%E_t) em relação á condição basal (pré-desafio com OVA). Após a oscilação mecânica, as fatias de tecido pulmonar periférico foram fixadas em formol 10% por 48 h e embebidos em parafina para análise histológica.

Figura 6– Aparato Experimental: equipamento de avaliação da mecânica oscilatória do tecido pulmonar periférico. A fatia pulmonar subpleural retirada de um dos pulmões foi suspensa em um aparato contendo solução de *Krebs* (37° C, pH= 7,4), sendo submetida à oscilação constante por meio de um transdutor de força e de um braço oscilatório que controla a frequência, amplitude e a forma de onda da oscilação (por meio de um gerador). Os dados de mecânica oscilatória obtidos foram convertidos em sinal digital, por meio de um conversor, transformados em dados analógicos e analisados.

3.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A homogeneidade das amostras tira utilizado foi assegurada por intermédio da medição da fração de componentes de tecido, utilizando o método de contagem de pontos (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009; Weibel, 2010). Utilizando uma grade de 100 pontos, com uma área conhecida (62.500 mM de 400X) acoplado à ocular microscópio (Figura 7) medimos a fração de parede brônquica, a de parede

dos vasos sangüíneos e de parede alveolar, conforme o número de pontos que caíram em qualquer uma destas estruturas, dividido pelo número total de pontos que caíram na tira de tecido. As medições foram realizadas em 10 campos por lâmina, em 400x.

Figura 7. Esquema da avaliação morfológica e histopatológica. Um retículo composto de 50 retas e 100 pontos foi acoplado a ocular do microscópio.

3.6.1 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CÉLULAS INOS POSITIVAS NO SEPTO ALVEOLAR

A imunohistoquímica utilizada para a pesquisa do anticorpo em tecido foi realizada pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase para o anticorpo

iNOS. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (3-aminopropil-trietoxi-silano-*Sigma*). As lâminas foram desparafinadas e hidratadas e, na seqüência, o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10V 3% (7 vezes de 5 minutos cada). Foi então feita a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura.

Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS. Finalizada a etapa dos bloqueios, a solução com o anticorpo primário iNOS título 1:400 (*LabVision, NeoMarkers, Fremont CA, EUA*) foi aplicada nos cortes histológicos dos animais em estudo assim como nos controles, tanto positivo quanto negativo (aplicado apenas BSA) e, em seguida, as lâminas foram incubadas durante todo o período da noite. As lâminas então foram lavadas em PBS e incubadas com o kit Vector ABC Elite (*HRP, Vector Laboratories, INC, Burlingame, CA, EUA*). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (*DakoCitomation, Carpinteria, CA, EUA*).

As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Alemanha*). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (*Merck, Darmstadt, Alemanha*).

QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS iNOS POSITIVAS PRESENTES NOS SEPTOS ALVEOLARES

A proporção de células positivas para iNOS foi determinada pelo número de células em cada campo dividido pela área de tecido no aumento de 1000x, por intermédio da técnica de contagem de pontos (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Starling et al., 2009; Weibel, 2010). Foram analisados 10 campos por corte, selecionados de forma randômica. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

$\text{Proporção de céls. no septo alveolar} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células nas quais incidiam pontos}}{\text{n}^\circ \text{ de pontos que incidiam no tecido alveolar}} \times 100$

3.6.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA ARGINASE 2 E NFkB

A técnica imunohistoquímica utilizada para a pesquisa da expressão de arginase 2 e NFkB foi realizada pelo método biotina-estreptavidina peroxidase. Os cortes histológicos a $3\mu\text{m}$ de espessura foram realizados em lâminas silanizadas (3-aminopropil-trietoxi-silano-Sigma) e seguiu-se o protocolo descrito.

As lâminas foram desparafinadas e hidratadas e seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) 10V 3% (7 vezes de 5 minutos cada), seguiu-se a lavagem com água corrente e PBS. Para o anticorpo da arginase 2 não foi necessária a recuperação antigênica. A recuperação antigênica do NFkB foi realizada em panela de pressão (Pascal), por 1 min a 125°C, com tampão citrato pH:6,0. Após os bloqueios, o anticorpo primário arginase 2, (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), título 1:120, e o anticorpo primário, cód. SC-109, (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), título 1:50, foram diluídos em BSA e aplicados sobre os cortes e controle de tecido, e incubadas por toda a noite. As lâminas então foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1 hora) e complexo (30 min) pelo ABCKit Vectastain (Vector Elite PK-6105 (anti-cabra para arginase) e (anti-coelho para NFkB) em estufa 37°C.

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB - Dako K 3466). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.6.3 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE PGF2 α

A imunohistoquímica para detecção do PGF2 α (isoprostano 8) foi realizada utilizando o anticorpo Anti-8-epi-PGF2 α (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, EUA) com diluição de 1:500. Os blocos foram desparafinados e lavados 7 vezes por 5 minutos com H₂O₂ 10V 3% para inibir a atividade de peroxidase endógena. Após banhos em PBS e água, a recuperação do antígeno foi realizada com tripsina por 20 minutos. Após isto, 3 banhos de 3 minutos/cada em PBS foram realizados.

Os cortes foram incubados com anticorpo Anti-8-epi-PGF2 α diluídos em BSA durante toda a noite. Após lavagem em PBS, Vectastain ABC Kit (Vector Elite PK- 6105, Burlingame, CA, EUA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi usado como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ARGINASE 2, NFkB E PGF2 α NOS SEPTOS ALVEOLARES:

A expressão da arginase 2, NFkB e PGF2 α foi avaliada por intermédio do programa *Image Pro Plus* (versão 4.5) (Prado et al, 2005; 2006), instalado em um microcomputador de padrão IBM acoplado a um

microscópio e câmera fotográfica digital. Em cada caso, foram capturadas 10 imagens em aumento de 400x vezes. Em cada imagem foi selecionada a área de interesse e aplicado um filtro pré-montado, com base em um número representativo de fotos, marcando as áreas positivas.

Para cada imagem foram coletados:

(1) área total;

(2) área positiva com base no padrão estabelecido;

(3) Densidade média de cor caracterizada pela média da intensidade de cor do padrão RGB (0 a 255), sendo que valores maiores representam áreas mais claras;

(4) Densidade óptica integrada (IOD) correspondente à densidade média de cada objeto marcado multiplicado pela área do mesmo.

A divisão do valor da somas dos IODs de cada objeto pela área total de positividade fornece um valor entre 0 e 255 correspondente a média ponderada da intensidade de cor.

3.6.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE ARGINASE 2

Para a avaliação da atividade da arginase, os reagentes do kit (BioAssay Systems - *Arginase Assay Kit (DARG-200)* foram utilizados a uma temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas em eppendorf de 2 ml com 300 a 400 ul de tampão (Tris HCl 20 mM, pH 7,4,

com PMSF 2 um) em *polytron PTA 20S* (*Brinkmann Instruments* modelo *PT 10/35*).

As soluções para os reagentes do kit foram: 1) tampão substrato: 5x-4 volumes do tampão de arginina e 1 volume da solução Mn (para cada quantificação foram necessários 10 ul do tampão substrato 5x); 2) reagente uréia: iguais volumes do reagente A e B (1:1); 3) Curva de uréia: 24 ul de uréia a 50 mg/dl em 176 ul de água.

Para a reação de arginase foi utilizado uma placa de 96 poços, 40 ul da amostra que foi plaqueada e adicionado 10 ul do tampão substrato 5x. Para os controles foi adicionado 40 ul da amostra (sem o tampão substrato 5x), e 50 ul de uréia à 1 mM. A placa foi incubada a 37°C por 2 horas.

Para interromper a reação da arginase foi adicionado 200 ul do reagente uréia em todos os poços; 10 ul do tampão substrato 5x nos poços das amostras (controle) onde não havia tampão; e por fim foi incubado por 60 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada à 430 nm.

QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE ARGINASE 2

A determinação da atividade da arginase 2 envolveu a medida da velocidade de reação. A velocidade da reação foi expressa em unidades (U).

Uma unidade (U) de atividade corresponde a um micromol consumido por minuto por mg de proteína. A atividade específica, portanto foi expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa *Sigma Stat* (Jandel Corporation, San Rafael, CA, EUA) sendo os valores expressos como média e erro padrão e representados em gráficos de barras paralelas.

Os resultados foram avaliados pela *Análise de Variância One-Way Analysis* e as comparações múltiplas entre os grupos foram feitas usando o método *Holm-Sidak*. A correlação de *Spearman* foi utilizada para comparações entre os dados morfométricos e os dados funcionais. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$ para todas as análises (Zar, 1984).

4

RESULTADOS

4.1 MEDIDAS DE MECÂNICA OSCILATÓRIA:

Não houve diferença na resistência tecidual (Rt) basal e na elastância tecidual (Et) basal entre os grupos estudados. As Figuras 8 e 9 mostram os valores de média e erro padrão do percentual de aumento da resistência e elastância tecidual (respectivamente), após desafio com antígeno em relação ao basal. Os animais expostos à ovalbumina apresentaram um aumento na Rt% ($104,44 \pm 16,28\%$) e Et% ($84,22 \pm 12,43\%$) em comparação com os grupos controle (Rt%: $11,23 \pm 3,28\%$; Et%: $6,65 \pm 1,96\%$, $p < 0,001$ para todas as comparações).

Nos animais sensibilizados, o tratamento com nor-NOHA diminuiu tanto a Rt% ($23,82 \pm 8,60\%$) quanto a Et% ($21,00 \pm 8,73\%$) em comparação com o grupo OVA ($p < 0,001$). A administração 1400W em animais expostos à ovalbumina reduziu a Rt% ($43,05 \pm 9,86\%$) e Et% ($34,82 \pm 8,61\%$) em comparação aos grupos OVA e SAL ($p < 0,001$). No grupo sensibilizado, a administração de nor-NOHA e tratamento com 1400W em animais expostos à ovalbumina reduziu a Rt% ($42,93 \pm 10,70\%$) e Et% ($31,44 \pm 8,68\%$) em relação ao grupo OVA ($p < 0,001$). No entanto, não houve diferenças entre os grupos OVA-NOR e OVA-NOR-W, tanto em relação a Rt% quanto a Et%.

Figura 8. Valores do percentual de aumento da resistência tecidual (Rt%) após a exposição ao antígeno (grupos: OVA, OVA-NOR, OVA-W e OVA-NOR-W) ou salina (grupo SAL). Os valores estão expressos em média e erro padrão. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos.

Figura 9. Valores do percentual de aumento de elastância tecidual (Et%) após a exposição ao antígeno (grupos: OVA, OVA-NOR, OVA-W e OVA-NOR-W) ou salina (grupo SAL). Os valores estão expressos em média e erro padrão. * $p < 0,001$ comparativamente aos demais grupos

4. 2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Não houve diferenças significativas entre o conteúdo de alvéolos, vias aéreas e vasos nas fatias de tecido pulmonar periférico, entre os cinco grupos experimentais.(Tabela 3).

Tabela 2. Proporção de alvéolos no fragmento de tecido pulmonar periférico nos cinco grupos experimentais. Os valores foram expressos em porcentagens (média $\pm$ erro padrão).

Grupos Experimentais	Proporção de alvéolos
SAL	93,05 $\pm$ 1,15%
OVA	90,47 $\pm$ 0,48%
OVA-NOR	92,03 $\pm$ 0,29%
OVA-W	90,28 $\pm$ 0,63%
OVA-NOR-W	92,31 $\pm$ 1,07%

4.3. MEDIDAS DE EXPRESSÃO DE ARGINASE 2

A figura 10 mostra os valores de média e erro padrão da avaliação da expressão de arginase 2. Houve um aumento na expressão de arginase 2 em animais expostos à ovalbumina em comparação com os expostos à solução salina ($18,45 \pm 1,22\%$ e $8,88 \pm 1,26\%$, respectivamente, $p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam nor-NOHA (grupo OVA-NOR) apresentaram menor expressão de arginase 2 ($10,23 \pm 0,78\%$) em comparação aos animais expostos ovalbumina (grupo OVA, $p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam 1400W e nor-NOHA apresentaram menor expressão de arginase 2 no tecido pulmonar em comparação aos animais OVA-W ($7,73 \pm 0,78\%$ e $13,88 \pm 1,54\%$, respectivamente, $p < 0,001$). No entanto, não houve diferenças entre os grupos OVA-NOR e OVA-NOR-W.

Figura 10. Valores da porcentagem de expressão de arginase 2 nos septos alveolares dos cinco grupos experimentais. * $p < 0,001$ comparativamente aos grupos SAL, OVA-NOR, OVA-W, e OVA-NOR-W. ** $p < 0,001$ comparativamente ao grupo OVA-NOR-W.

4.4. MEDIDAS DE ATIVIDADE DE ARGINASE 2

A Figura 11 mostra os valores de média e erro padrão da avaliação da atividade de arginase 2. Houve um aumento na atividade de arginase 2 em animais expostos à ovalbumina em comparação com os expostos à solução salina ($8,89 \pm 1,11$ mU/mg e $4,98 \pm 0,15$ mU/mg, respectivamente, $p < 0,05$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam nor-NOHA (grupo OVA-NOR) apresentaram menor atividade de arginase 2 ($4,09 \pm 0,66$ mU/mg) em comparação aos animais expostos à ovalbumina ($p < 0,05$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam tratamento com 1400W e nor-NOHA apresentaram menor atividade de arginase 2 no tecido pulmonar em comparação aos animais OVA-W ($3,71 \pm 0,60$ mU/mg e $7,96 \pm 2,13$ mU/mg, respectivamente, $p < 0,05$). No entanto, não houve diferenças entre os grupos OVA-NOR e OVA-NOR-W.

Figura 11. Valores de atividade de arginase 2 nos septos alveolares dos cinco grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL, OVA-NOR e OVA-NOR-W. Não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-W.

4.5. AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS iNOS POSITIVAS

A Figura 12 mostra o número de células iNOS positivas no septo alveolar dos cinco grupos experimentais. Os animais expostos à ovalbumina mostraram um aumento no número de células iNOS positivas no septo alveolar ($35,84 \pm 2,71$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação com animais expostos à solução salina ($7,08 \pm 0,67$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam nor-NOHA (OVA-NOR) apresentaram uma redução no número de células iNOS positivas ($10,22 \pm 0,78$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em comparação aos expostos à ovalbumina (grupo OVA, $p < 0,001$). O tratamento com 1400W reduziu o número de células iNOS positivas em animais sensibilizados (grupo OVA-W) em comparação àqueles expostos à ovalbumina ($p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam 1400W e nor-NOHA apresentaram uma redução do número de células iNOS positivas no tecido pulmonar em comparação aos animais OVA-W ($12,32 \pm 0,63$ e $28,26 \pm 2,18$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $p < 0,001$). No entanto, não houve diferenças entre os grupos OVA-NOR e OVA-NOR-W.

Figura 12. Valores do número de células iNOS-positivas nos septos alveolares dos cinco grupos experimentais. * $p < 0,001$ com os grupos SAL, OVA-NOR, OVA-W, e OVA-NOR-W. ** $p < 0,001$ comparativamente ao grupo OVA-NOR-W.

4.6. MEDIDAS DE AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE ISOPROSTANO PGF2 α

A Figura 13 mostra os valores de média e erro padrão da porcentagem de expressão de isoprostano PGF2 α nos cinco grupos experimentais. Observamos um aumento da expressão de isoprostano PGF2 α no septo alveolar de cobaias expostas à ovalbumina ($10,14 \pm 0,79\%$) em comparação com aqueles expostos apenas salina ($3,77 \pm 0,36\%$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam nor-NOHA (grupo OVA-NOR) mostraram uma menor expressão de isoprostano PGF2 α ($4,93 \pm 0,43\%$) em comparação aos expostos apenas à ovalbumina ($p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam 1400W e nor-NOHA mostraram uma menor expressão de isoprostano PGF2 α no septo alveolar em comparação com os animais do grupo OVA-W ($0,77 \pm 0,24\%$ e $2,79 \pm 0,27\%$, respectivamente, $p < 0,001$). Houve uma redução de expressão de isoprostano PGF2 α no septo alveolar do grupo OVA-NOR-W em relação ao grupo OVA-NOR ($p < 0,001$).

Figura 13. Valores da percentagem de expressão de isoprostanos PGF2 α . * $p < 0,001$ aos grupos SAL, OVA-NOR, OVA-W e OVA-NOR-W. ** $p < 0,001$ comparativamente ao grupo OVA-NOR-W.

4.7. MEDIDAS DE EXPRESSÃO DE NF-kB

A Figura 14 mostra o percentual de expressão de NF-kB no septo alveolar de animais dos cinco grupos experimentais. Os animais expostos à ovalbumina mostraram um aumento na expressão NF-kB no conteúdo do septo alveolar ($14,60 \pm 0,42\%$) em comparação aos animais expostos à solução de salina ($6,09 \pm 0,40\%$, $p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam nor-NOHA (OVA-NOR) mostraram uma redução de expressão de NF-kB ($6,09 \pm 0,64\%$) em comparação com os animais expostos à ovalbumina ($p < 0,001$). O tratamento com 1400W diminuiu a expressão de NF-kB em animais sensibilizados (OVA-W grupo) em comparação com aqueles expostos à ovalbumina ($p < 0,001$). Os animais expostos à ovalbumina que receberam 1400W e nor-NOHA apresentaram menor expressão de NF-kB no septo alveolar em comparação com os animais do grupo OVA-W ($4,50 \pm 0,49\%$ e $12,27 \pm 0,45\%$, respectivamente, $p < 0,001$). No entanto, não houve diferenças entre os grupos OVA-NOR e OVA-NOR-W.

Figura 14. Valores da proporção do volume de expressão de NF-kB nos septos alveolares dos cinco grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL, OVA-NOR, OVA-W e OVA-NOR-W.

** $p < 0,001$ comparativamente aos animais do grupo OVA-NOR-W.

4.8. ANÁLISE DESCRITIVA

A Figura 15 mostra microfotografias representativas de tecido pulmonar distal de cobaias dos cinco grupos experimentais submetidos às colorações imunohistoquímicas para detecção de arginase 2 e iNOS. O grupo controle apresentou quantidades escassas de expressão de arginase 2 e células iNOS positivas em seções do tecido alveolar, coincidindo com a manutenção da histoarquitetura dos septos alveolares. Por outro lado, o parênquima pulmonar distal dos animais tratados com veículo e expostos à ovalbumina mostraram um aumento de arginase 2 e nas células iNOS positivas. Os tratamentos isolados com 1400W e nor-NOHA em animais expostos à ovalbumina reduziram todos estes parâmetros em relação ao observado no grupo OVA.

Figura 15. Amostras de tecido pulmonar de cobaias obtidos a partir de animais controles (painéis A e B), expostos à ovalbumina e tratados com veículo (painéis C e D), expostos à ovalbumina e que receberam nor-NOHA (painéis E e F), expostos à OVA e tratados com 1400W (painéis G e H) e expostos à ovalbumina que foram tratados com 1400W e que receberam nor-NOHA no banho (painéis I e J). Os cortes foram submetidos à análise imunohistoquímica para detecção de arginase 2 (painéis A,C,E,G e I - x400), iNOS (painéis B,D, F,H e J- x1000).

A Figura 16 mostra microfotografias representativas de tecido pulmonar distal de cobaias dos cinco grupos experimentais submetidos às colorações imunohistoquímicas para detecção de NF-kB e isoprostano PGF2 α . O grupo controle apresentou quantidades escassas de NF-kB e isoprostano PGF2 α em seções do tecido alveolar, coincidindo com a manutenção da histoarquitetura dos septos alveolares. Por outro lado, o parênquima pulmonar distal dos animais tratados com veículo e expostos à ovalbumina mostraram um aumento na expressão de NF-kB e isoprostano PGF2 α . Os tratamentos isolados com 1400W e nor-NOHA em animais expostos à ovalbumina reduziram todos estes parâmetros em relação ao observado no grupo OVA. A associação de ambos os tratamentos (grupo OVA-NOR-W) contribuiu para uma redução mais intensa da expressão de isoprostano PGF2 α em relação ao grupo OVA-W.

Figura 16. Amostras de tecido pulmonar de cobaias obtidos a partir de animais controles (painéis K e L), expostos à ovalbumina e tratados com veículo (painéis M e N), expostos à ovalbumina e que receberam nor-NOHA (painéis O e P), expostos à OVA e tratados com 1400W (painéis Q e R) e expostos à ovalbumina que foram tratados com 1400W e que receberam nor-NOHA no banho (painéis S e T). Os cortes foram submetidos à análise imunohistoquímica para detecção de NF-kB (painéis K,M,O,Q e S- x400), e isoprostano PGF2 α (painéis L,N,P,R e T- x400).

5

DISCUSSÃO

Demonstramos em cobaias com inflamação pulmonar crônica que houve um aumento na expressão de arginase 2, células positivas iNOS e estes resultados foram associados à constrição do parênquima pulmonar distal. A expressão aumentada da iNOS contribui para a ativação da via de estresse oxidativo com formação de isoprostano PGF2 α , que tem um efeito pró-contrátil. Além disso, sugerimos que o mecanismo envolvido na ativação das vias arginase 2 e iNOS pode estar, provavelmente, relacionado com a modulação da expressão NF-kB.

O tratamento com nor-NOHA ou 1400W isoladamente em animais expostos à ovoalbumina atenuou a resposta de elastância e resistência teciduais após desafio antigênico, reduzindo o número de células iNOS positivas, o conteúdo de PGF2 α , arginase 2 e NF-kB no septo alveolar. Porém a atividade da arginase 2 só foi reduzida nos grupos que foram tratados com nor-NOHA e na associação de 1400W e nor-NOHA. Finalmente, foi demonstrado que a associação de ambos os inibidores (1400W e nor-NOHA) potencializam a redução de isoprostano PGF2 α e da expressão de NF-kB neste modelo animal.

As eficácias destes protocolos de tratamento foram demonstradas, visto que houve uma redução significativa do número de células iNOS positivas e do conteúdo de arginase 2 no tecido pulmonar de animais expostos à ovalbumina e tratados com 1400W e nor-NOHA, respectivamente. Confirmamos estudos anteriores que sugeriam que a

administração de 1400W apresenta uma seletividade *in vivo* para iNOS (Garvey et al., 1997) e que o nor-NOHA é um inibidor potente e seletivo de arginase 2 (Custot et al., 1996; Benson et al., 2011).

É importante considerar que, pela primeira vez, em um modelo animal de inflamação alérgica crônica, foi demonstrado que houve um aumento na expressão de arginase 2 no parênquima pulmonar distal. Uma série de estudos têm relatado um aumento na atividade arginase nas vias aéreas, tanto em modelo agudo como crônico de inflamação alérgica pulmonar (Maarsingh et al., 2005; 2007a; 2009; Meurs et al., 2000). O aumento da atividade de arginase e / ou da sua expressão também tem sido demonstrada em outros modelos animais, utilizando diferentes antígenos em diferentes espécies (Maarsingh et al., 2008; Abe et al., 2006).

Em vias aéreas de asmáticos, a expressão de iNOS é marcadamente aumentada por citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e de IFN- γ , predominantemente em células inflamatórias e no epitélio das vias aéreas (Hamid et al., 1993; Asano et al., 1994; Barnes et al., 1998). Este aumento da iNOS está associada a eosinofilia, à hiperreatividade das vias aéreas e ao aumento de NO no ar exalado (Ricciardolo et al., 2004; Kharitonov et al., 1994, 2000; Prado et al., 2011).

Prado et al. (2005, 2008) também encontraram uma redução de células iNOS e nNOS positivas após o tratamento com um inibidor específico

da iNOS e pelo L-NAME. No entanto, poucos autores avaliaram os efeitos da inibição do óxido nítrico sintase na modulação das respostas inflamatórias e funcionais que ocorrem no parênquima pulmonar com uma resposta inflamatória crônica (Angeli et al., 2008; Starling et al., 2009).

Alguns estudos também sugeriram que a atividade da arginase pode afetar a reatividade das vias aéreas proximais (Meurs et al., 2003; Zimmermann; Rothenberg, 2006; Maarsingh et al., 2009). O primeiro estudo, envolvendo a avaliação da arginase na fisiopatologia da asma, foi descrito por Meurs et al. (2000). Usando preparação de anéis traqueais perfundidos de cobaias tratadas com um potente e específico inibidor da arginase, o *n*-ω-hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA), os autores demonstraram uma inibição da constrição induzida pela metacolina de forma dose-dependente e que foi revertida pela L-NAME. Isto indicou que a arginase está envolvida na modulação da resposta das vias aéreas, provavelmente pela limitação da ação broncodilatadora das cNOS.

Maarsingh et al. (2006) demonstraram que de forma semelhante ao nor-NOHA, a L-arginina exógena restaurou o relaxamento das vias aéreas em cobaias após a reação alérgica imediata. Os resultados demonstraram que a atividade endógena da arginase atenua os efeitos das vias nervosas, mediadas pelo sistema iNANC. Este efeito depende da inibição da geração de NO, provavelmente limitando a disponibilidade a L-arginina para cNOS. Outro inibidor específico da arginase 2, o 2(S)-aminoborono-hexanoico ácido

ou (ABH) foi capaz de reverter a hiperresponsividade presente na reação alérgica imediata e tardia após o desafio com a histamina em um modelo de asma alérgica aguda, provavelmente relacionado ao aumento da produção de NO (Maarsingh et al., 2008).

De Boer et al. (1996), utilizando um modelo de asma alérgica em cobaias, investigaram o papel do óxido nítrico na hiperresponsividade das vias aéreas após indução da reação alérgica asmática imediata, examinando os efeitos de um falso substrato para todas as óxido nítrico sintases (L-NAME) na responsividade à metacolina e histamina de traquéias isoladas de animais sensibilizados. Os autores também demonstraram que a deficiência de NO contribuiu para a indução da hiperresponsividade das vias aéreas após a reação alérgica imediata por alérgenos.

Angeli et al. (2008) analisaram as respostas de mecânica oscilatória do pulmão distal de cobaias com inflamação pulmonar crônica. Os autores observaram que os animais sensibilizados e tratados com L-NAME tiveram uma redução, tanto na resistência como na elastância do tecido pulmonar após o desafio antígeno.

Starling et al. (2009), avaliando as alterações funcionais do pulmão distal induzido pela inflamação crônica, constaram que o tratamento com 1400W diminuiu a resposta tanto da elastância como da resistência tecidual em animais expostos à ovalbumina. Em conjunto, esses estudos mostraram

que o óxido nítrico contribui para a constrição do parênquima pulmonar neste modelo experimental. É possível também que haja uma diminuição da produção de NO broncodilatadora, presumivelmente pela competição com cNOS para o substrato comum, L-arginina, como já sugerido por outros estudos anteriormente discutidos (Meurs et al., 2000; Maarsingh et al., 2005).

Nos pulmões, as isoenzimas constitutivas (cNOS) são expressas principalmente em células endoteliais (eNOS), em nervos inibitórios não-adrenérgicas não-colinérgicas (nNOS) e em células epiteliais (nNOS e eNOS) (Fischer et al., 1993; Asano et al., 1994). No entanto, no presente estudo não avaliamos a modulação da expressão de enzimas constitutivas de óxido nítrico, a fim de confirmar se a inibição de iNOS ou arginase 2 poderia contribuir para um aumento na expressão de cNOS. Há evidências na literatura que a inibição de uma das óxido nítrico sintases possa interferir na expressão das demais (Meurs et al., 2002; Ricciardolo et al., 2004).

Prado et al. (2005) estudaram os efeitos da inibição aguda da produção de óxido nítrico em um modelo de inflamação crônica das vias aéreas em cobaias. Os autores demonstraram que a inibição crônica e inespecífica da produção de NO, por meio do LNAME, resultou em intensa broncoconstrição basal após estímulo antigênico, particularmente em vias aéreas proximais, além de reduzir o número de células mononucleares, a formação de edema peribrônquico e de aumentar a deposição de fibras colágenas na parede das vias aéreas distais. Por outro lado, a inibição

específica e seletiva de iNOS, por meio do 1400W, reduziu a broncoconstrição, a inflamação e o processo de remodelamento brônquico em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias.

Além disso, NO derivado da eNOS foi capaz de inibir a inflamação das vias aéreas pela ativação da supressão do NF- κ B, inibindo assim tanto a expressão de iNOS quanto a produção de citocinas inflamatórias (Thomassen et al., 1997).

De Boer et al. (1996) demonstraram, em modelo de asma alérgica de cobaias, que a deficiência de NO broncodilatador derivado da cNOS contribui para a hiperresponsividade das vias aéreas, e que esta deficiência é devido a uma limitação da L-arginina como substrato para cNOS. Diferentes mecanismos poderiam explicar esta limitação. Um mecanismo envolve inibição da absorção celular de L-arginina pelos transportadores catiónicos específicos para aminoácidos, incluindo a proteína básica principal eosinofílica (Meurs et al., 1999). Um segundo mecanismo seria uma redução da biodisponibilidade de L-arginina, devido à atividade da arginase, que hidrolisa L-arginina em L-ornitina e ureia (Maarsingh et al., 2009).

Demonstramos que os animais expostos à ovalbumina mostraram um aumento no número de células iNOS positivas no septo alveolar em comparação com animais expostos à solução salina. Os animais que foram

tratados com nor-NOHA associada ou não ao 1400W mostraram uma menor quantidade de células iNOS positivas no tecido pulmonar. Considerando que a L-arginina é o substrato comum para ambas óxido nítrico sintases bem como as arginases, é possível que o bloqueio de uma destas vias enzimáticas possa afetar a outra pela concorrência para o mesmo substrato (Meurs et al., 2002;. Ricciardolo et al., 2004; Maarsingh et al., 2006).

No presente estudo, avaliamos os efeitos da inibição da arginase em alterações funcionais do parênquima pulmonar distal. Demonstramos que o nor-NOHA diminuiu o aumento máximo na resistência e da elastância teciduais após desafio com ovalbumina em animais sensibilizados, sugerindo que arginase contribui para a modulação da hiperresponsividade específica neste modelo experimental.

Uma possibilidade para explicar estes resultados podem estar relacionados a um efeito de nor-NOHA na modulação da via iNOS devido à competição do NOHA, que ainda não foi precisamente descrita. Outra hipótese é que, durante o período do experimento, no qual as fatias do pulmão distal estavam em contato com nor-NOHA, houve uma diminuição na expressão NF-kB, com uma conseqüente diminuição da expressão de arginase 2 e iNOS. Isto levaria a uma redução da ativação das vias de estresse oxidativo, as quais contribuem para a constrição pulmonar.

Para testar esta hipótese, avaliamos a expressão de NF-kB no pulmão

distal neste estudo. Demonstramos que o tratamento com 1400W ou nor-NOHA diminuiu a expressão NF- κ B em animais sensibilizados e houve potencialização da redução do NF- κ B com a associação das duas drogas, comparativamente ao grupo tratado com 1400W. Neste sentido, Ckless et al. (2007) também mostraram que a ativação de NF- κ B pode induzir um aumento das NOS e arginase.

Demonstramos também que houve uma redução de isoprostano PGF2 α em animais expostos à ovalbumina que receberam nor-NOHA ou 1400W. Ogino et al., (2011) demonstraram que o nível sérico de arginase 2 foi associado com o de isoprostano PGF2 α em indivíduos saudáveis, podendo se tornar um novo biomarcador precoce para a previsão da ativação da via do estresse oxidativo. Esses achados também corroboram a idéia de que não só a iNOS, mas também a ativação da via da arginase, aumentam a resposta de estresse oxidativo podendo ter efeitos prejudiciais na estrutura do tecido do pulmão, como demonstrado previamente (Angeli et al., 2008;. Starling et al., 2009).

Outro ponto a ser discutido é que a associação de ambos os inibidores potencializou a redução do isoprostano PGF2 α , sem contudo modificar a mecânica oscilatória. Considerando a importância dos isoprostanos como agentes contráteis, esperávamos que houvesse um efeito mais proeminente na mecânica pulmonar em animais que receberam os dois inibidores. Além disso, De Boer et al. (2001) mostraram que o

aumento da formação de peroxinitritos, elementos pró-inflamatórios e pró-contráteis, desempenha um papel importante na hiperresponsividade. É possível que, para efetivamente reduzir respostas de mecânica oscilatória pulmonar, possam ser necessárias doses maiores de inibidores. Outra possibilidade é que a mecânica pulmonar distal, seja também modulada por outras vias, particularmente por outros mecanismos inflamatórios, para as quais o inibidor da arginase 2 seja menos efetivo.

Embora tivéssemos mencionado anteriormente algumas limitações do presente estudo, pretendemos também apontar que os resultados obtidos em modelos animais têm de ser cuidadosamente transpostos para os seres humanos. No entanto, é importante lembrar que as cobaias são um dos melhores modelos animais para estudar a asma, visto que a sua anatomia pulmonar é similar aos seres humanos, e algumas das características da asma humana, como processo inflamatório eosinofílico e a presença de remodelamento (Tibério et al., 1997, Ricciardolo et al., 2008).

Outro ponto a ser considerado é que avaliamos apenas os efeitos da inibição da arginase 2 no parênquima pulmonar distal. Na verdade, mais estudos precisam ser realizados com o tratamento crônico com inibidores da arginase 2 em animais intactos. Neste sentido, nossa principal limitação para realizar esse tratamento esteve relacionada ao alto custo desta droga.

6

CONCLUSÕES

Deste modo, no parênquima distal em cobaias com inflamação crônica pulmonar, concluímos que houve aumento de células iNOS positivas da expressão de $\text{PGF2}\alpha$, NF-kB, e arginase 2 no tecido pulmonar periférico. Além disso, houve aumento da constrição do parênquima distal, representado pelo aumento da Rt e Et após desafio antigénico.

Nos animais sensibilizados o tratamento com o inibidor da iNOS atenuou a mecânica tecidual, o aumento de células iNOS positivas, a expressão de isoprostano $\text{PGF2}\alpha$, de arginase 2 e de NF-kB no septo alveolar. A inibição de iNOS não reduziu a atividade da arginase 2.

A inibição da arginase 2 neste modelo de inflamação alérgica crônica atenuou a mecânica tecidual, o aumento de células iNOS positivas, a expressão de isoprostano $\text{PGF2}\alpha$, de arginase 2 e de NF-kB no septo alveolar.

A associação dos dois tratamentos (nor-NOHA e iNOS) potencializou a redução da expressão de isoprostano $\text{PGF2}\alpha$, controlando a resposta de estresse oxidativo.

O presente estudo sugere que a inibição destas vias enzimáticas pode representar uma estratégia futura para o tratamento de pacientes com asma grave e de difícil controle.

Abe M, Hayashi Y, Murai A, Shibata K, Sakata N, Igarashi R, Katsuragi T, Tanaka K. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibitors on asthma depending on administration schedule. *Free Radic. Biol. Med.* 2006;40:1083-1095.

Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011;128(3):451-462.

Alving K, Fornhem C, Weitzberg E, Lundberg JM. Nitric oxide mediates cigarette smoke-induced vasodilatory responses in the lung. *Acta Physiol Scand.* 1992;146(3):407-8.

Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva P L, Passaro CP, Nakazato H D, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PR, Tiberio 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:L1197-L1205.

Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F et al. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J.* 1995; 8:483-91.

Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10089–10093.

Bachofen H, Lung tissue resistance and pulmonary hysteresis. *J Appl Physiol.* 1968;24:296-301.

Baddedge RC, Moore PK, Gathen Z, Hart SL. L-NG-nitroarginine pnitroanilide (L-NAPNA): a selective inhibitor of nitric oxide synthase in the

brain. *Br J Pharmacol*.1993;107:194P.

Barnes PJ and Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*.1993;48:1034–1043.

Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*. 1998;50:515-596.

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

Benson RC, Hardy KA and Morris CR. Arginase and Arginine Dysregulation in Asthma. *Journal of Allergy*. 2011;ID: 736319.

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

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

Bratt, J.M.; Franzi, L.M.; Linderholm, A.L.; Last, M.S.; Kenyon, N.J.; Last, J.A. Arginase enzymes in isolated airways from normal and nitric oxide synthase 2 knockout mice exposed to ovalbumin. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2009; 234: 273-280.

Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ and Newman JH. *Am. J. Physiol*. 1992;263:H660–H663.

Breekveldt-Postma NS, Erkens JA, Aalbers R, van de Ven MJ, Lammers JW, Herings RM. Extent of uncontrolled disease and associated medical costs in

severe asthma – a PHARMO study. *Curr Med Res Opin.* 2008;24:975-983.

Calhoun WJ, Reed HE, Moest DR, et al. Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1992;145:317–25.

Cerchiaro GA, Scavone C, Texeira S, and Sannomiya P, Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: Role of insulin. *Biochemical Pharmacology.* 2001;62(3) 357–362.

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

Chong Neto HJ, Rosário NA, Solé D; Asthma and Rhinitis in South America: How Different They are from Other Parts of the World. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2012 March;4(2):62-67.

Cisternas, M.G., Blanc, P.D., et al. A comprehensive study of the direct and indirect costs of adult asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111 (6):1212-8.

Cockcroft DW, Killian DN, Mellon JJ, Hargreave FE. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a method and clinical survey. *Clin. Alergia.* 1997;7:235-243

Coers W, Timens W, Kempinga C, Klok PA and Moshage H. Specificity of antibodies to nitric oxide synthase isoforms in human, guinea pig, rat and mouse tissues. *J Histochem Cytochem.*1998;46:1385-1392.

Cortijo J, Perpiñá M, Esplugues J, Morcillo EJ. Pharmacological characterization of the effects of verapamil and nifedipine on isolated guinea-

pig lung parenchymal strip. *Br. J. Pharmac.* 1984;83:161–167.

Cortijo J, Martí-Cabrera M, De La Asunción JG, et al. Contraction of human airways by oxidative stress protection by N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:392–400.

Culotta E. and Koshland DE. “No news is good news,” *Science* 1992;258 (5090):1862–1865.

Custot J, Moali C, Brollo M, Boucher JL, Delaforge M, Mansuy D, Tenu JP, Zimmermann JL. The new alpha-amino acid N-omega-hydroxy-nor-L-arginine: a high affinity inhibitor of arginase well adapted to bind to its manganese cluster. *J Am Chem Soc* 1996;119:4086-4087.

De Boer J, Meurs H, Coers W, Koopal M, Bottone AE, Visser AC, Timens W, Zaagsma J. Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. *Br J Pharmacol.* 1996;119:1109-1116.

De Boer J, Meurs H, Flendrig L, Koopal M, Zaagsma J. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 2001;133:1235-1242.

De Sanctis GT, Mehta S, Kobzik L et al., Contribution of type I NOS to expired gas NO and bronchial responsiveness in mice. *American Journal of Physiology.* 1997;273 (4): 883–888.

Dolhnikoff M, Mauad T and Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin- induced fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 1999;160:1750-7.

Dworski R. Oxidant stress in asthma *Thorax.* 2000;55(Supl2):S51-3.

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

Famm SS, Morrow JD. The isoprostanes: Unique products of arachidonic acid oxidation—a review. *Curr Med Chem*. 2003;10:1723–1740.

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

Fonseca JA; Botelho C. Asma grave. *Rev. bras. alerg. imunopatol* 2006;29:70-76.

Foreman JC, Rising TJ, Webber SE. A study of the histamine H₂-receptor mediating relaxation of the parenchymal lung strip preparation of the guinea-pig. *Br. J. Pharmac*. 1985; 86:465-473.

Garcia MLB, Paiva PSO, Dolhnikoff M, Jancar S, Saldiva PHN, and Martins MA. Airway and pulmonary tissue responses to platelet-activating factor in rats. *Exp Lung Res*. 1994;20:169–184.

Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJR and Knowel RG. 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem*. 1997;272(8), 4959-4963.

Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Diagnosis and Prevention. *Global Initiative for Asthma* (updated 2011). Available from <http://www.ginasthma.org>.

Groves, JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999;3:226-235.

Guzik TJ, Korbust R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation *Journal of Physiology and Pharmacology.* 2003;54(4)469–487.

Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet.* 1993;342:1510–1513.

Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:1273-6.

Iyengar R, Stuehr D. J., and Marletta M. A., “Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1987;84(18):6369–6373.

Högman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G. Inhalation of nitric oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. *Eur Respir J.* 1993;6:177-80.

Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, Gaston B. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):694-9.

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

Iyengar R, Stuehr DJ, and Marletta MA, Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84(18) 6369–6373.

Johannes CCM In 't Veen, Beekman AJ, Bel EH, and Sterk PJ, “Recurrent exacerbations in severe asthma are associated with enhanced airway closure during stable episodes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2000;161(6):1902–1906.

Kang, HK, Morrow, JD, Roberts, LJ, Newman, JH and Banerjee, M. Airway and Vascular Effects of 8-Epi-prostaglandin F2 in Isolated Perfused Rat Lung. *J. Appl. Physiol*. 1993;74:460–465.

Kenyon NJ, Bratt JM, Angela L. Linderholm AL, Michael S, Jerold A. Arginase I and II in Lungs of Ovalbumin-Sensitized Mice Exposed to Ovalbumin: Sources and consequences. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;230(3): 269–275..

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne E A, and Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343:133 –135.

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

Kochanski L, Kossmann S, Rogala E, Dwornicki J. Sputum arginase activity in bronchial asthma. *Pneumonol Pol*. 1980;48:329-332.

Kopp EB, Ghosh S. NF-k B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995; 58:1–27.

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

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

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

Kuo HP, Liu S, Barnes PJ. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol*. 1992;221(2-3):385-8.

Lai, J., R. A. Rogers, B. A. Ekstein, and J. J. Fredberg. Dynamic changes in alveolar duct geometry in response to 1023 M histamine (abstract). *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149:A538.

Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:6348-52.

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

Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274(35):24441-4.

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

2004;34:145-152.

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

Ludwig, MS. Role of lung parenchyma. In PJ Barnes, MM Grunstein, AR Leff, and Woolcock AJ. *Asthma*. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997:1319-1334.

Maarsingh H, Leusink J, Bos IST, Zaagsma J, Meurs H: Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respir Res*. 2006;7:6.

Maarsingh H, Zuidhof AB, Bos IS, van Duin M, Boucher JL, Zaagsma J, Meurs H. Arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178: 565–573.

Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *British Journal of Pharmacology*. 2009;158: 652–664.

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

Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernard FD, Martins MA, Saldiva PH and 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.

Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:997-1009.

Mauad T, Dolhnikoff M, Ferreira DS, Simões SM, Souza-Machado A. Imunopatologia e remodelamento na asma grave. *Gaz. méd. Bahia*. 2008;78(2):75-85

Mauad T, Poon A H, Hamid Q. Pathology, inflammation and cytokines of severe asthma. *Eur Respir Mon* 2011;51:97-106.

McCluskie K, Birrell M A, Wong S, and Belvisi M G. Nitric oxide as a noninvasive biomarker of lipopolysaccharide- induced airway inflammation: possible role in lung neutrophilia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;311(2):625–633.

Meng Q-H, Polak JM, Edgar AJ, Chacon MR, Evans TJ, Gruenert DC, Bishop AE. Neutrophils enhance expression of inducible nitric oxide synthase in human normal but not cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *J Pathol*. 2000;190:126-32.

Meurs H, Schuurman FE, Duyvendak M, Zaagsma J. Deficiency of nitric oxide in polycation-induced airway hyperreactivity. *Br. J. Pharmacol*. 1999;126: 559-562.

Meurs H, Hamer M A M, Pethe S, Goff S V, Boucher J, Zaagsma J. Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *British Journal of Pharmacology*. 2000;130:1793 -1798.

Meurs H, McKay S, Maarsingh H, Hamer M , Macic L, Molendijk N, Zaagsma J. Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *British Journal of Pharmacology*. 2002;136:391–398.

Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J: Arginase and asthma: novel insights into

nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:450-455.

Milne GL, Yin H, Brooks JD, Sanchez S, Jackson Roberts L 2nd, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as a measure of oxidant stress. *Methods Enzymol.* 2007;433:113-26.

Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(23):15533-7.

Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Internações por Asma reduzem 51% em dez anos. Brasília: MS; 2011.

Moncada S, Palmer RMJ, and Higgs EA. "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. " *Pharmacological Reviews* 1991;43(2)109–142.

Moncada S, and Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 2003;329(27):2002-12.

Morris CR, Poljakovic M, Lavrishia L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM, Jr.: Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:148-153.

Morrow, JD, Harris TM, and Roberts LJ. Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for the measurement of eicosanoids. *Anal. Biochem.* 1990;184:1–10.

Nakashima AS, Prado CM, Lanças T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IFI. Oral tolerance attenuates changes in invitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. *J Appl*

Physiol. 2008;104 (6):1778-85.

Norman V. Keith and C. H., "Nitrogen oxides in tobacco smoke," *Nature*. 1965; 205 (4974): 915–916.

North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasemann H, Scott JA. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.*, 2009: 296(911-920).

Ogino k, Takahashi N, Takigawa T, Obase Y and Wang D. Association of serum arginase I with oxidative stress in a healthy population. *Free Research*. 2011;45: 147-155.

Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, and J. A. Mitchell. Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB Journal*. 1999; 13(13)1810–1816.

Ponte EV, Souza-Machado A, Souza-Machado C, Franco R, Cruz AA. Clinical characteristics and prognosis in near-fatal asthma patients in Salvador, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2011;37(4):431-437.

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

Prado CM, Leick- Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA and Tibério IF. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Biol* 2006;35(4):457-65.

Prado C M, Leick-Maldonado E A, Miyamoto L et al. "Capsaicin-sensitive nerves and neurokinins modulate nonneuronal nNOS expression in lung," *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2008;160(1):37–44.

Prado CM, Martins MA, Tiberio IF. Nitric Oxide in Asthma Physiopathology. *International Scholarly Research Network. ISRN Allergy*. 2011;13.

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

Que, L.G.; Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am. J. Physiol* 1998;275:L96-L102.

Racke K and Warnken M. "L-arginine metabolic pathways" *The Open Nitric Oxide Journal* 2010;2:9–19.

Redington AE, "Modulation of nitric oxide pathways: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Pharmacology*. 2006;533(1–3): 263–276.

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

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

Ricciardolo FL, Frans N, Rose, V D, Gert F. The Guinea Pig as an Animal Model for Asthma. *Current Drug Targets*. 2008;9:452-465,.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1:520-4.

Romero PV, Rodriguez B, Lopez-Aguilar J, Manresa F. Parallel airways inhomogeneity and lung tissue mechanics in transition to constricted state in rabbits. *J Appl Physiol*. 2001;84:1040-1047.

Rus AC, Lourdes M, Luisa M, Ángeles P. Inducible NOS inhibitor 1400W reduces hypoxia/re-oxygenation injury in rat lung. *Redox Report*. 2010;15(4):169-178.

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

Santos LA, Oliveira MA, Faresin SM, Santoro IL, Fernandes AL. Direct costs of asthma in Brazil: a comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:943-948.

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.

Sedgwick, JB, Geiger, KM, Busse WW. Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:120-125.

Souza-Machado C, Souza-Machado A, Franco R, Ponte EV, Barreto ML, Rodrigues LC, et al. Rapid reduction in hospitalisations after an intervention to manage severe asthma. *Eur Respir J*. 2010;35(3):515-21.

Starling CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LR, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF: Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model

of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respiratory Physiology and Neurobiology*. 2009;165:185-94.

Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL and Badr KF. *J Clin Invest*. 1992;90(1):136-141.

Thomassen MJ, Buhrow LT, Connors MJ, Kaneko FT, Erzurum SC, Kavuru MS. Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;17:279–28

Tian J, Yan Z, Wu Y, Zhang SL, Wang K, Ma XR, Guo L, Wang J, Zuo L, Liu JY, Quan L, Liu HR. . Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(10):1324-8.

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

Tibério IFLC, Leick-Maldonado EA, Miyahara L, Kasahara DI, Spilborghs GMGT, Saldiva PHN, and Martins MA. Effects of neurokinins on airway and alveolar eosinophil recruitment. *Exp Lung Res*. 2003;29:167–177.

Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, Warth TN, Lapa e Silva JR, Saldiva PH and 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:S7–S10.

Thomassen MJ, Buhrow LT, Connors MJ, Kaneko FT, Erzurum SC, Kavuru MS, “Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar

macrophages,” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1997; 17(3): 279–283.

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

Vizzard MA, Erdman SL and Groat,WC “Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in dorsal root ganglion neurons after systemic capsaicin administration”. *Neuroscience*. 1995;67(1):1–5.

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

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, and Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:829–837.

Zhang P, Wang YZ, Kagan E, Bonner JC. Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J Biol Chem*. 2000;275:22479-22486.

Zar JH. Biostatistical Analysis. 2. ed. *Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc* 1984;206-235.

Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest*. 2003;111:1863–1874

Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol* 2006;533(1-3):253-6.

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

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

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

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

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