LUCIANA RITHA DE CÁSSIA ROLIM BARBOSA ARISTÓTELES

**Anti-IL17 na modulação da mecânica pulmonar, inflamação,
estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular
em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica
exarcebada pelo LPS**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos
Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de Fátima
Lopes Calvo Tibério

São Paulo

2018

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 Cassia Rolim Barbosa

Anti-IL17 na modulação da mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica exacerbada pelo LPS / Luciana Ritha de Cassia Rolim Barbosa Aristóteles. -- São Paulo, 2018.

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

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

Orientadora: Iolanda de Fatima Lopes Calvo Tibério.

Descritores: 1.Asma 2.Modelos Animais 3.Camundongos 4.Interleucina-17
5.Lipopolissacarídeos 6.Inflamação 7.Estresse Oxidativo

USP/FM/DBD-239/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

A Deus toda honra e toda glória sempre

DEDICATÓRIA

A meus pais, Antenor (in memoriam) e Dona Cadora,
Que me ensinaram a ousar, questionar e, acima de tudo a amar.
Com eles, aprendi a desejar aquilo que mais guia o que eu sou:
Dar sempre o melhor de mim, em qualquer situação.
Com amor,
agradeço a vocês pelo que sou

À Valentina,
Que ainda no meu ventre, transporta-me para um mundo de
cores. Até então, um norte desconhecido aos meus olhos. Filha...
Repasso o que aprendi...
Ouse, questione, e acima de tudo, ame! Seja sempre ao meu
lado.
Quero te encher de beijos

À Cris,
Por não ter desistido e por não me fazer desistir. Por ter sido
instrumento de Deus na minha vida. Pelos pensamentos “pipa”,
que inúmeras vezes, disparou o meu sorriso. Amou... E por fim,
tudo deu certo. Amo-Te!
A minha eterna gratidão

À Profª Iolanda,
Palavreando metros e metros em pensamentos: Mãos que
sempre me conduziram com afeto. Uma Doutora também em ser
humano. Que me ensinou com suas palavras, reflexões e
conversas, que dar brilho ao olhar das pessoas é um bom motivo
para se fazer ciência. Incentivou e acreditou. Inquieta busca. A
orientadora, a MÃE. Obrigada por tudo. Obrigada por me ensinar.
Carregarei para sempre com orgulho, a sua influência.
Beijos na alma

AGRADECIMENTOS

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossas vidas e a prova evidente que duas almas não se encontram por acaso”.

Antoine de Saint-Exupéry

A minha família que tanto amo. Sempre acreditei na dinâmica familiar e confesso que me orgulho do alicerce que fomos criados. Vocês são referências para mim, fizeram também o que sou. Obrigada!

E não só a família preciso agradecer, mas a pessoas como Claudia Jeanne Claudino de Pontes, amiga de 28 anos, a mais antiga, viu muitas mudanças que me transformaram no que sou hoje. Foi a irmã que escolhi. Sempre acompanhou os movimentos, sonhos e angustias do meu coração. Agradeço a você minha amiga simplesmente por existir e fazer parte da minha vida. Te amo muito.

À Carla Máximo e Edna Leick obrigada pelos ensinamentos que penduram desde a época do mestrado. Carlinha como sempre com seu raciocínio “trem bala”. Todas as vezes que precisei, estava presente. Edninha minha amiga DD, não consigo pensar na faculdade de medicina sem lembrar de você. Essa tese é fruto de tudo que vivemos e aprendemos juntas.

Em especial eu agradeço aos amigos e colaboradores dessa tese: Renato Righetti, Tabata Maruyama, Leandro Camargo, Flávia Ribas e Silvia Fukuzaki. Sem a ajuda de cada um eu não teria conseguido chegar até aqui. Vocês me ensinaram que sempre podemos fazer mais. Lembro-me dos nossos momentos de correria e rostos cansados, mas estávamos ali. Como também ficarão na minha memória os sorrisos de uma equipe que sempre acreditou que tudo daria certo. Registro aqui a minha gratidão. Compartilho a minha felicidade com vocês.

Profa. Vera Capelozzi pelas fotos e por todo apoio dado sempre que a procurei. A sua presença foi essencial e necessária. A Profa. Fernanda Lopes que sempre gentilmente estava presente e disposta a nos ajudar no que fosse necessário. Tenho admiração e um grande carinho por você.

À Rosana, secretária deste laboratório, que carinhosamente chamo de “formiguinha”. Sempre que se fazia jus, seu apoio estava lá. Obrigada, particularmente com as questões burocráticas e também por poder contar com a sua amizade. Você é muito especial.

Ao Prof. Milton Martins, Profa. Alonso Vale e Maysa Cruz da UNIFESP; Sandra e Esmeralda da imunohistoquímica; David do biotério, Amigas e pesquisadoras do LIM 20: Beatriz Saraiva, Clarice Olivo, Francine Almeida e Sara pelas colaborações diretas e indiretas neste estudo.

Aos amigos do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, pelo apoio e por sempre dizer sim quando necessitei trocar horários e plantões para a realização dos experimentos e participação em aulas e congressos.

NORMALIZAÇÃO

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas e quadro

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Asma brônquica	2
1.1.1 Definição.....	2
1.1.2 Classificação.....	3
1.1.3 Epidemiologia	5
1.1.4 Inflamação	8
1.2 Citocinas IL-17	13
1.3 Quimiocinas TARC e Eotaxina	17
1.4 Remodelamento	18
1.5 Sistema colinérgico anti-inflamatório	35
1.6 Fator de transcrição NF- <i>KB</i>	39
1.7 Modelo experimental de inflamação crônica pulmonar e de exacerbação pelo LPS	41
1.8 Justificativa	44
2 OBJETIVOS.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 Grupos Experimentais	48
3.2 Protocolo de sensibilização com ovoalbumina	49
3.3 Tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17.....	49
3.4 Modelo murino de sensibilização a ovalbumina exacerbado pelo LPS.....	50
3.5 Medida do óxido nítrico exalado (NO exalado).....	51

3.6	Avaliação da mecânica do sistema respiratório	51
3.7	Histologia e morfometria das vias aéreas.....	52
3.8	Extração de RNA, transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR).....	54
3.9	Análise Estatística	55
4	RESULTADOS.....	56
4.1	Curva dose respostas máximas à metacolina	57
4.2	Óxido nítrico exalado (NO exalado)	59
4.3	Linfócitos CD4+, CD8+, células dendríticas e células reguladoras T FOXP3	60
4.4	Expressão gênica de VACHT/ mRNA	63
4.5	Expressão celular de p65-NFkB.....	64
4.6	Expressão celular de ROCK1 e ROCK2	65
4.7	RT-PCR e análise morfométrica para IL17.....	67
4.8	Análise morfométrica de marcadores inflamatórios nas vias aéreas	69
4.9	Análise morfométrica para marcadores de remodelamento nas vias aéreas	71
4.10	Análise morfométrica para marcadores da via NO-arginase e estresse oxidativo nas vias aéreas.....	73
4.11	Análise qualitativa.....	75
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÕES.....	89
7	REFERÊNCIAS	92

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh:	Acetilcolina
AChE:	acetilcolinesterase
AHR:	hiperresponsividade
ASM:	músculo liso das vias aéreas
CCL17:	Ligante 17 da quimiocina (C-C) - também conhecido como TARC
ChAT:	enzima colina acetiltransferase
CLM:	cadeia leve da miosina
COX:	ciclooxigenase
DNA:	ácido desoxirribonucleico
EAR:	Respostas alérgicas imediatas
eNOS:	óxido nítrico sintase endotelial
FEV1:	Volume expiratório forçado em 1 segundo
GATA3:	Fator de transcrição
Grupo Ova- anti-IL17:	Inalações com solução de OVA e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17
Grupo OVA:	Inalações com solução de ovoalbumina (OVA)
Grupo OVA-LPS:	Inalações com solução de ovoalbumina e instilação de LPS

Grupo OVA-LPS-anti-IL17: Inalações com solução de ovoalbumina, instilação de LPS e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17

Grupo SAL: Inalações com soro fisiológico (SF)

Grupo SAL-anti-IL17: Inalações com soro fisiológico e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17

HRVA: hiperresponsividade das vias aéreas

I.P: Injeção intraperitoneal

IFN- γ : Interferon gama

IgE: Imunoglobulina E

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

JLABA: Beta-agonista de longa ação

LAR: Respostas alérgicas tardia

LBA: Lavado broncoalveolar

LPS: Lipopolissacarídeos

MEC: Matriz extra celular

MMPs: Metaloproteinases

nAChRs: Receptor nicotínico de acetilcolina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido

NANC: Sistema nervo não adrenérgico e não colinérgico

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear

nNOS: óxido nítrico sintase neural

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintases

O₂⁻ : radicais superóxido

ONOO⁻ : peroxidnitrito

OVA: Ovoalbumina

RBM:	membrana basal reticular subepitelial
RNS:	espécies reativas de nitrogênio
ROS:	espécies reativas de oxigênio
SNP:	Sistema nervoso parassimpático
SNS:	Sistema nervoso simpático
TCD4+:	Linfócitos TCD4+
TGF- β :	Fator de transformação do crescimento beta
Th2:	linfócitos Th2
TIMPs:	Inibidores das metaloproteinases
TNF- α :	Fator de necrose tumoral
TNF- α :	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
VACHT:	Transportador vesicular de acetilcolina
$\alpha 7$ nAChR:	Receptor nicotínico $\alpha 7$ de acetilcolina

FIGURAS

Figura 1 -	Mapa do mundo de prevalência da asma infantil (GINA 2015).....	6
Figura 2 -	Percentagem de indivíduos asmáticos por região acima de 18 anos no Brasil	7
Figura 3 -	Taxas de mortalidade da asma brutas e ajustadas pela idade e tendências em indivíduos nas faixas etárias de 0 a 4 anos e 5 a 34 anos no Brasil, de 1980 a 2014.....	8
Figura 4 -	Mecanismos alérgenos	11
Figura 5 -	Processo de remodelamento das vias aéreas	19
Figura 6 -	Esquema demonstrativo das vias de produção de óxido nítrico e arginase	27
Figura 7 -	Vias de sinalização molecular envolvidas na contração das células musculares lisas induzidas por agonista.....	32
Figura 8 -	Mecanismo de sensibilização ao cálcio e contração no músculo liso	33
Figura 9 -	Topologia e a sequência de aminoácidos do transportador vesicular de acetilcolina de rato	37
Figura 10 -	Síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina.....	38
Figura 11 -	Esquema representativo demonstrando a translocação do NF-κB para o núcleo	41
Figura 12 -	Esquema representativo demonstrando a via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFκB e de outros fatores de transcrição	43
Figura 13 -	Protocolo de sensibilização com ovoalbumina, tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17 e modelo murino de sensibilização a ovalbumina exacerbado pelo LPS	50
Figura 14 -	Esquema demonstrando realização da mecânica do sistema respiratório.....	52

Figura 15 -	Fotomicrografia exemplificando o posicionamento do retículo na via aérea, para realização da técnica de contagem de pontos.....	54
Figura 16 -	Média $\pm$ SE de % aumento da Rrs (a) e Ers (b) após o desafio da metacolina	58
Figura 17 -	Média $\pm$ SE de óxido nítrico exalado.....	59
Figura 18 -	Média $\pm$ SE de células CD4 + e CD8 +, células dendríticas e células T reguladoras FOXP3	62
Figura 19 -	Média $\pm$ SE de Expressão de VACHT/ mRNA.....	63
Figura 20 -	Média $\pm$ SE de células positivas p65-NFkB	64
Figura 21 -	Média $\pm$ SE de ROCK1 (a) e ROCK2 (b)	66
Figura 22 -	Média $\pm$ SE da RT-PCR (a) e análise morfométrica (b) para IL17	68
Figura 23 -	Média $\pm$ SE da análise morfométrica para a via NO-arginase e estresse oxidativo.....	74
Figura 24-	Marcadores inflamatórios, de remodelamento e de estresse oxidativo	78

TABELAS E QUADRO

Tabela 1 -	Média $\pm$ SE da análise morfométrica de marcadores inflamatórios nas vias aéreas.....	70
Tabela 2 -	Média $\pm$ SE da análise morfométrica para marcadores de remodelamento nas vias aéreas	72
Quadro 1 -	Definição dos diferentes níveis de controle da asma de acordo com GINA	4

RESUMO

Aristóteles LRCRB. *Anti-IL17 na modulação da mecânica pulmonar, inflamação, estresse oxidativo e remodelamento da matriz extracelular em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica exarcebada pelo LPS* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: As citocinas de perfil Th17 parecem exercer um papel importante na fisiopatogenia da inflamação pulmonar alérgica crônica, embora sua exata influência seja incerta. Estudos demonstram uma influência destas citocinas em modular a resposta inflamatória e infecciosa. É importante enfatizar que a infecção é um dos responsáveis por perpetuar a resposta inflamatória crônica na asma, particularmente durante as exacerbações. Muitos dos efeitos desta via ainda não foram investigados em modelos de inflamação alérgica pulmonar crônica (asma) exarcebada pelo lipopolissacarídeos (LPS). **Objetivos:** Avaliar os efeitos do tratamento com anti-IL-17 em um modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica exarcebada pelo LPS. **Métodos:** Camundongos BALB/c foram submetidos ao protocolo de indução alérgica crônica das vias aéreas com ovoalbumina ou salina e com posterior desafios inalatórios por 28 dias. Nos 1° e 14° dias um grupo (grupo OVA) recebeu ovoalbumina 50 mg em hidróxido de alumínio 6mg em um volume total de 0,2 ml por via intraperitoneal. Do 22° ao 28° dia, os animais receberam em dias alternados, inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/ml (1%) por 30 minutos. Ao mesmo tempo, o grupo controle (grupo SAL) recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (6 mg) por via intraperitoneal e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% também por 30 minutos. Uma hora antes da inalação de ovoalbumina ou de salina, o anticorpo neutralizador anti-IL17 foi administrado por via intraperitoneal (ip) (grupos OVA-antiIL17 e SAL-antiIL17). Vinte e quatro horas antes do final do protocolo experimental (28° dia) um grupo de animais (grupo OVA-LPS) recebeu instilação traqueal de LPS (20 µl de PBS + 0,1 mg / ml de *Escherichia coli* 0127: B8). O grupo sensibilizado que recebeu LPS e anti-IL17 uma hora antes da exposição ao LPS foi chamado de OVA-LPS-antiIL17. No 29° dia do protocolo, os animais foram eutanasiados e inicialmente foram avaliadas as respostas máximas à metacolina da resistência e elastância do sistema respiratório. Os pulmões foram retirados e realizados as análises histológicas e morfométricas para

avaliar a expressão celular de CD4+, CD8+, células dendríticas e células reguladoras T FOXP3; RT-PCR para arginase 1, transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) e IL-17; ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B); o número de células positivas para ROCK 1 e ROCK 2; resposta inflamatória de perfis Th1 (IL-2, IL-6, e TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), Th-17 (IL-17), quimiocinas CCL17/TARC e CCL11/Eotaxina; resposta de remodelamento da matriz extracelular (conteúdo de fibras colágenas tipos I e III, decorina, lumican, biglicano, fibronectina, actina, TGF β 1, o número de células positivas para MMP-9, MMP-12 e TIMP-1), e a resposta de estresse oxidativo (o número de células positivas para iNOS e conteúdo de isoprostano PGF2 α e Arginase 1). Além disso, avaliamos por reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR) a expressão gênica de IL-17 e mRNA para VACHT. As análises estatísticas foram realizada por meio do programa SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA), onde um $p < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** O grupo OVA-LPS-antiIL17 apresentou uma diminuição na resposta máxima pós metacolina de elastância e resistência do sistema respiratório, NO exalado, o número de células positivas para CD4+ e CD8+, células dendríticas, células T reguladoras FOXP3, mRNA para VACHT, NF- κ B, ROCK1 e 2, quimiocinas CCL17 / TARC, e CCL11 / eotaxina, IL2 IL4, IL5, IL6, IL10, IL13 e IL17 nas paredes das vias aéreas comparado aos grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com anti-IL17 reduziu o remodelamento brônquico (conteúdo de fibras colágenas I e III, decorina, lumican, biglican e fibronectina nas paredes das vias aéreas) assim como o número de células positivas para TGF β 1, MMP-9, MMP12 e TIMP-1 ao redor das vias aéreas em comparação ao grupo SAL ($p < 0.05$). Houve também a atenuação de todos os parâmetros exceto no grupo OVA-antiIL17 em comparação ao grupo OVA ($p < 0.05$). Quanto ao estresse oxidativo o tratamento com o anti-IL17 também foi efetivo. Observamos redução de expressão celular de iNOS, conteúdo de PGF2 α e expressão gênica de arginase1 em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Ainda, observamos uma atenuação do anti-IL17 na expressão gênica de IL17 e VACHT. **Conclusões:** A inibição da IL17 contribuiu para o controle da hiperresponsividade brônquica, da inflamação Th1/Th2/Th17, da expressão de quimiocinas, do remodelamento da matriz extracelular e da resposta da via NO-arginase, do sistema colinérgico sinalizado pela avaliação do VACHT e de estresse oxidativo no modelo de asma experimental. No modelo de asma experimental exacerbado pelo LPS houve potencialização das respostas de hiperresponsividade das vias aéreas distais, assim como da maioria dos marcadores de resposta inflamatória, de remodelamento da matriz extracelular e da ativação das vias via NO-arginase e do estresse oxidativo. O tratamento com anti-IL17 nesses animais foi capaz de controlar a maior parte das alterações citadas, exceto o conteúdo de actina. Dentre os mecanismos envolvidos no controle pelo tratamento com anti-IL17 das alterações estudadas no modelo de asma experimental exacerbado pelo LPS observamos a importância da expressão do fator de transcrição NF κ B e de Rho quinase 1, e expressão gênica mRNA para VACHT. Embora outros mecanismos possam estar envolvidos e doses repetidas de anti-IL17 nos

animais com asma exacerbado pelo LPS também necessitem ser testadas, o tratamento com anti-IL17 se mostrou uma ferramenta farmacológica importante para o tratamento das alterações, que à semelhança do observado nestes modelos experimentais, também se observam em pacientes com asma grave mesmo associada a quadros infecciosos agudos.

Descritores: Asma; Modelos animais; Camundongos; Interleucina-17; Lipopolissacarídeos; Inflamação; Estresse Oxidativo.

SUMMARY

Aristóteles LRCRB. *Anti-IL17 in the modulation of pulmonary mechanics, inflammation, oxidative stress and remodeling of the extracellular matrix in mice with chronic allergic pulmonary inflammation exacerbated by LPS* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Introduction: Th17 cytokines appear to play an important role in the pathophysiology of chronic allergic pulmonary inflammation, although their exact role is uncertain. Studies have demonstrated an influence of these cytokines in modulating the inflammatory and infectious response. It is important to emphasize that infection is one of the factors responsible for perpetuating the chronic inflammatory response in asthma, particularly during exacerbations. Many of the effects of this pathway have not yet been investigated in models of chronic allergic lung inflammation (asthma) exacerbated by lipopolysaccharide (LPS). **Objectives:** To evaluate the effects of anti-IL17 treatment on a model of chronic allergic pulmonary inflammation exacerbated by LPS. **Methods:** BALB/c mice were submitted to protocol of chronic allergic induction of the airways with ovalbumin or saline and with subsequent inhaled challenges for 28 days. On days 1 and 14 a group (OVA group) received ovalbumin 50 mg in 6 mg aluminum hydroxide in a total volume of 0.2 ml intraperitoneally. From the 22 to the 28 day, the animals received, on alternate days, aerosol inhalation of OVA diluted in NaCl 0.9% (saline solution) at a concentration of 10 mg/ml (1%) for 30 minutes. At the same time, the control group (SAL group) received saline solution (NaCl 0.9%) and aluminum hydroxide (6 mg) intraperitoneally and on the days of the inhalation challenges were exposed to aerosol 0.9% saline solution for 30 minutes. One hour prior to inhalation of ovalbumin or saline, the anti-IL17 neutralizing antibody was administered i.p. (OVA-anti-IL-17 and SAL-anti-IL17 groups). Twenty-four hours before the end of the experimental protocol (28th day) one group of animals (OVA-LPS group) received LPS tracheal instillation (20 µl PBS + 0.1 mg/ml *Escherichia coli* 0127: B8). The sensitized group that received LPS and anti-IL17 an hour before exposure to LPS was called OVA-LPS-anti-IL-17. On the 29th day of the protocol, the animals were euthanized and initially the maximum methacholine responses of resistance and elastance of the respiratory system were evaluated. The lungs were removed and the histological and morphometric analysis were performed to evaluate the cell expression of CD4+, CD8+, dendritic cells and T regulatory cells FOXP3; RT-PCR for arginase 1, vesicular acetylcholine transporter (VACHT) and IL-17; activation of nuclear transcription factor

KappaB (NF κ B); the number of positive cells for ROCK 1 and ROCK 2; Th1 (IL-2, IL-6, and TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13), Th-17 (IL-17), CCL17 chemokines/TARC and CCL11 / Eotaxin; (content of collagen fibers types I and III, decorin, lumican, biglycan, fibronectin, actin, TGF β 1, number of cells positive for MMP-9, MMP-12 and TIMP-1), and the response of oxidative stress (the number of positive cells for iNOS and isoprostane content PGF2 α and Arginase 1). In addition, we evaluated the gene expression of IL-17 and mRNA for VACHT by real-time PCR. Statistical analysis were performed using the SigmaStat program (Jandel Scientific, San Rafael, CA), where a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results: The OVA-LPS-anti-IL-17 group showed a decrease in post-methacholine maximal response of elastance and respiratory system resistance, exhaled NO, number of CD4 + and CD8 + positive cells, dendritic cells, FOXP3 regulatory T cells, mRNA for VACHT, ($p < 0.05$), and in the presence of a significant increase in the expression of IL-1, IL-6, IL-10, IL-13 and IL17 in the airway walls compared to OVA and OVA-LPS ($p < 0.05$). In addition, anti-IL17 treatment reduced bronchial remodeling (content of collagen fibers I and III, decorin, lumican, biglycan and fibronectin in the airway walls) as well as the number of TGF β 1, MMP-9, MMP-12 and TIMP-1 around the airways compared to the SAL group ($p < 0.05$). There was also attenuation of all parameters except in the OVA-antiIL17 group compared to the OVA group ($p < 0.05$). As for oxidative stress, treatment with anti-IL17 was also effective. We observed reduction of iNOS cell expression, PGF2 α content and arginase1 gene expression in comparison to OVA and OVA-LPS groups ($p < 0.05$). Furthermore, we observed an attenuation of the anti-IL17 in the IL17 and VACHT gene expression. **Conclusions:** Inhibition of IL-17 contributed to the control of bronchial hyperresponsiveness, Th1/Th2/Th17 inflammation, chemokine expression, extracellular matrix remodeling and NO-arginase pathway response, cholinergic system signaled by VACHT and of oxidative stress in the experimental asthma model. In the model of experimental asthma exacerbated by LPS there was a potentiation of hyperresponsiveness responses of the distal airways, as well as of the majority of inflammatory response markers, extracellular matrix remodeling and activation of the pathways via NO-arginase and oxidative stress. Treatment with anti-IL-17 in these animals was able to control most of the above-mentioned changes, except the actin content. Among the mechanisms involved in the control by anti-IL17 treatment of the alterations studied in the model of experimental asthma exacerbated by LPS, we observed the importance of the expression of the transcription factor NF-Kappa B and Rho kinase 1, and gene expression mRNA for VACHT. Although other mechanisms may be involved and repeated doses of anti-IL17 in animals with LPS-exacerbated asthma also need to be tested, treatment with anti-IL17 has proved to be an important pharmacological tool for the treatment of the changes, which similar to those observed in these experimental models, are also seen in patients with severe asthma associated with acute infectious conditions.

Descriptors: Asthma; Models animal; Mice; Interleukin-17; Lipopolysaccharides; Inflammation; Oxidative Stress.

INTRODUÇÃO | 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASMA BRÔNQUICA

1.1.1 Definição

A definição da asma é baseada em características clínicas, fisiológicas e fisiopatológicas. A última definição foi elaborada pela “*Global Initiative National of Asthma*” (GINA, 2017), a saber:

”asma é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, sendo definida pela história de sintomas respiratórios como sibilos, falta de ar, opressão torácica e tosse que variam ao longo do tempo e em intensidade, associada à limitação variável ao fluxo de ar das vias aéreas”.

Com alto impacto social e econômico, a doença afeta indivíduos de ambos os sexos em todas as faixas etárias e pode ser fatal (Lloyd; Hessel, 2010; Poon, Eidelman et al., 2012).

Em sua versão de 2017, a *Global Initiative for Asthma* (GINA) define o controle da asma em dois domínios:

1. Avaliar o controle de sintomas durante as últimas 4 semanas: averiguar presença e frequência de sintomas diários e ou semanais, despertar noturno, alívio necessário para sintomas mais de duas vezes por semana e qualquer limitação de atividade devido à asma, e
2. Avaliar durante o diagnóstico e periodicamente os fatores de risco considerados ruins para asma como: exacerbações, limitação fixa do fluxo aéreo e efeitos colaterais da medicação, medindo a FEV1 no início do

tratamento, após 3 a 6 meses de tratamento e periodicamente depois disso.

Contudo, atualmente a avaliação do controle da asma é baseada apenas em sintomas e uso de medicação de resgate deve ocorrer individualmente com base na gravidade dos sintomas de asma em intervalos de 3-6 meses após o início do tratamento (GINA, 2017).

1.1.2 Classificação

Diversas diretrizes nacionais e internacionais para o manejo da asma tais como a GINA, e o Programa Nacional de Asma Educação e Prevenção (NAEPP) do *National Heart, Lung and Blood Institute (NIH)* vem aperfeiçoando ao longo dos anos na definição de controle da asma. Recentemente estas duas diretrizes classificaram a asma em três níveis: asma controlada, asma parcialmente controlada e asma não controlada (ou grave) (GINA, 2017; NAEPP, 2017) (Quadro1).

Estima-se que asmáticos graves representam 5% a 10% da população de pacientes com asma (Barnes, 2013). Atualmente, está associada a uma forma de doença não controlada, com risco aumentado de desenvolver exacerbações graves envolvendo risco de vida (Übel et al., 2014). GINA define asma grave como: a asma que requer tratamento com dose média ou alta de corticosteroide inalatório associado a beta-agonista de longa ação (LABA) ou outra medicação, ou que exige a adição de anti-IgE ou corticoide oral (último nível do manejo terapêutico) com a intenção de manter o quadro controlado (GINA, 2017).

Quadro 1 - Definição dos diferentes níveis de controle da asma de acordo com GINA

AVALIAÇÃO DO CONTROLE CLÍNICO ATUAL (últimas quatro semanas)			
Parâmetros	Asma controlada	Asma parcialmente controlada	Asma não controlada
	Todos os parâmetros abaixo	Um ou dois parâmetros abaixo	Três ou mais dos parâmetros da asma parcialmente controlada
Sintomas diurnos	Nenhum ou ≤ 2 por semana	3 ou mais por semana	
Limitação de atividades	Nenhum	Qualquer	
Sintomas/ despertares noturno	Nenhum	Qualquer	
Necessidade de medicação de alívio	Nenhum ou ≤ 2 por semana	3 ou mais por semana	
AVALIAÇÃO DOS RISCOS FUTUROS (exacerbações, instabilidade, declínio acelerado da função pulmonar e efeitos adversos)			
Características que estão associadas com aumento dos riscos de eventos adversos no futuro: mau controle clínico, exacerbações frequentes no último ano, admissão prévia em UTI, baixo VEF ₁ , exposição à fumaça de tabaco e necessidade de usar medicação em altas dosagens.			

Fonte: Adaptado de GINA, 2017.

Apesar de representarem uma proporção pequena, esses pacientes com asma grave consomem um grande percentual dos recursos investidos no cuidado desse grupo de doentes (Scott et al., 2016), por isso, esse grupo torna-se alvo das investigações em torno da doença. Alguns pacientes graves podem persistir com alteração da função pulmonar mesmo nos períodos de remissão do quadro clínico. Portanto, a busca por fatores de risco para obstrução não reversível do fluxo aéreo em pacientes com asma tem sido objetivo de vários estudos (Wenzel, 2013; Tai et al., 2014).

Entretanto, tem sido um desafio entender e estudar a prevalência da asma e seus diferentes fenótipos (Bousquet et al., 2010; Wenzel, 2012). Talvez o fenótipo de “asma grave” venha merecendo mais atenção, não

apenas pela gravidade, mas porque essa população necessita de mais investimentos, mais atenção e necessidade maior de acompanhamento regular (Chung et al., 2014; Schleich et al., 2016; Kim et al., 2016).

1.1.3 Epidemiologia

Apesar dos avanços nas pesquisas científicas em relação ao tratamento e o melhor entendimento da fisiopatologia da asma, ainda são significativas as consequências pessoais, econômicas e sociais ocasionadas por essa doença (GINA, 2017).

Independentemente de seu nível de desenvolvimento econômico, muitos países consideram a asma como um problema de saúde pública que atinge pessoas de todas as idades e etnias. Estima-se que aproximadamente 300 milhões de indivíduos são afetados pela asma no mundo (GINA, 2017), destes a maioria é constituída por crianças (Zar; Levin, 2012) (Figura 1).

Caracterizada como um importante problema de saúde pública em termos de prevalência, morbidade e mortalidade, estima-se que a asma afete uma em cada sete crianças e um em cada doze adultos em países ocidentais, sendo responsável por 20 milhões de faltas diárias ao trabalho e escola (Holgate et al., 2010; Ribeiro-Filho et al., 2013; Gold et al., 2014).

Fonte: GINA, 2017.

Figura 1 - Mapa do mundo de prevalência da asma infantil (GINA, 2015)

No Brasil, a asma é responsável por número representativo de internações hospitalares, Segundo Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos (Figura 2). Sendo 3,9 milhões do sexo feminino e 2,4 milhões do sexo masculino, ou seja, prevalência de 39% a mais entre as mulheres (Datasus, 2015).

Fonte: (Datasus, 2015)

Figura 2 - Percentagem de indivíduos asmáticos por região acima de 18 anos no Brasil

Dados extraídos do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) do Departamento de Tecnologia da Informação do Sistema Único de Saúde (SUS) apontam redução linear e constante no número total de mortes atribuídas à asma para as faixas etárias de 0 a 4 anos e 5 a 34 anos relativos ao período de 1980 a 2014 (Figura 3). Quanto ao número total de óbitos, por mil habitantes (taxa bruta de mortalidade da asma) houve uma flutuação nos dados; inicialmente houve uma redução e, em seguida, um aumento seguido de outra redução caracterizando um padrão polinomial durante o período analisado. A introdução do uso de corticosteroides inalatórios e as campanhas de vacinação contra influenza por meio de políticas públicas de controle da asma coincidiu com uma diminuição significativa das taxas de mortalidade da asma em ambos os subgrupos (Graudenz et al., 2017).

Porém, evidências recentes sugerem que o controle da asma ainda está abaixo do ideal, especialmente naqueles pacientes com asma grave, mesmo com recentes avanços na compreensão da epidemiologia, fisiopatologia e manejo terapêutico da doença (Price et al., 2014).

Fonte: Adaptado de Graudenz et al., 2017.

Figura 3 - Taxas de mortalidade da asma brutas e ajustadas pela idade e tendências em indivíduos nas faixas etárias de 0 a 4 anos e 5 a 34 anos no Brasil, de 1980 a 2014

1.1.4 Inflamação

Tendo em vista a importância de células inflamatórias na fisiopatogenia da asma, o efeito inibitório dos fármacos na diferenciação, ativação e migração dessas células tornou-se um aspecto de extrema relevância na busca de novos tratamentos, além de contribuir para o melhor entendimento de várias terapias (Chung et al., 2015; Parulekar et al., 2016). Alguns estudos de asma grave sugerem que persistência ou alteração no padrão de inflamação pode ser associada com a gravidade da doença (Hesham, 2016; Shein et al., 2016). Diferenças na expressão das principais citocinas e quimiocinas relevantes aos perfis neutrofílico e eosinofílico na inflamação das vias aéreas dos asmáticos graves tem sido determinada (Choy et al., 2015).

A inflamação brônquica resulta de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas e constitui-se

como o mais importante fator fisiopatológico da asma (Galli et al., 2008). As células envolvidas na resposta inflamatória desenvolvida, através dos seus mediadores, causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neuronal e no tônus das vias aéreas, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso das vias aéreas (Elias et al., 2004; Galli, et al., 2008).

Embora existam diversos fenótipos para asma, a forma alérgica é a que tem recebido maior atenção por parte dos pesquisadores nos últimos anos. O processo de sensibilização é a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro da asma alérgica (Galli, et al., 2008). Inicialmente alérgenos inalados são captados e processados por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, que estão presentes na mucosa brônquica. Estas células são capazes de reconhecer, processar o antígeno e apresentar seus fragmentos peptídios ligados à molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHCII) aos linfócitos T CD4+ (Hawrylowicz; O'Garra, 2005).

Os linfócitos T CD4+, em indivíduos com predisposição genética, se diferenciam em linfócitos Th2 que produzem citocinas nos pulmões dos pacientes asmáticos, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Lloyd; Hessel, 2010). As citocinas produzidas pelos linfócitos T fazem com que estas células estimulem a produção da imunoglobulina E (McGeachie et al., 2016) pelos linfócitos B (fase de sensibilização alérgica), além de estimular a proliferação de mastócitos, ativação e aumento da sobrevivência de eosinófilos. De fato a IgE é a principal imunoglobulina associada a patogênese da resposta alérgica tendo um papel central na indução e manutenção da inflamação na asma (Dullaers et al., 2012). Além disso, estudos epidemiológicos e observações clínicas apontam uma importante correlação entre os níveis de IgE e a gravidade da asma (Manise et al., 2016). Após a fase de sensibilização do indivíduo e frente a nova exposição ao antígeno, a IgE liga-se aos receptores de alta afinidade expressos em mastócitos e basófilos (Harris et

al., 1995), o que induz a desgranulação mastocitária e consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios.

A exposição ao alérgeno resulta em duas fases distintas da resposta asmática. Na primeira fase, chamada de imediata, ocorre contração do músculo liso, edema de mucosa, produção de muco e aumento da permeabilidade vascular que podem se estender por até 3h após o contato com o alérgeno. Após esta fase, pode ocorrer uma resposta mais tardia, que se inicia de 3 à 6h após a exposição ao alérgeno e com a chegada de leucócitos recrutados (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). De maneira geral a fase imediata é caracterizada pela hiperresponsividade brônquica, enquanto a fase tardia é marcada principalmente pelo grande influxo de eosinófilos para as vias aéreas e liberação de mediadores pró-inflamatórios (Hawrylowicz; O'Garra, 2005). Desta forma, diversas células tais como células epiteliais, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T e B, contribuem de maneira efetiva para fisiopatogênese da asma, sendo os mastócitos, linfócitos Th2 e os eosinófilos as células mais importantes (Figura 4) (Lemanske; Busse, 2010).

Os eosinófilos são células características da inflamação alérgica, e sua função biológica na asma está associada a inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica e obstrução ao fluxo aéreo (Lemanske; Busse, 2010), o que ocorre tanto em pacientes asmáticos como em modelos experimentais de asma. Durante as respostas alérgicas de perfil Th2, os eosinófilos são recrutados a partir da medula óssea e do sangue periférico para os locais da inflamação (Kita, 2013).

A inflamação é um fator primordial para o desenvolvimento dos sintomas da asma, e nesse processo a participação dos linfócitos T helper tipo 2 (Th2) é importante devido os efeitos que as citocinas e quimiocinas liberadas por essas células provoca nas vias aéreas (Holgate, 2012). De fato, ao longo dos anos, evidências apontam para a contribuição específica dos linfócitos Th2 na asma tanto em humanos (Van Rensen et al., 2009, Wu

et al., 2011; Choy DF et al., 2015) como em modelos de asma (Angeli et al., 2008; Toledo et al., 2012; Righetti et al., 2014).

Fonte: Adaptado de Hawrylowicz e O'Garra, 2005.

Figura 4- Mecanismos alérgenos. Em indivíduos pré-dispostos, a exposição inicial ao alérgeno leva à ativação de células específicas para alérgenos T helper 2 (Th2) e síntese de IgE, o que é conhecido como sensibilização alérgica. Exposições subsequentes ao alérgeno causam recrutamento de células inflamatórias e ativação e liberação de mediadores, que são responsáveis pelas respostas alérgicas imediatas (EAR) e tardia (LAR). Na EAR, dentro de minutos de contato com o alérgeno, os mastócitos sensibilizados por IgE desgranulam, liberando mediadores nos indivíduos sensibilizados. Estes mediadores incluem histamina, leucotrienos e citocinas, que promovem permeabilidade vascular, contração do músculo liso e produção de muco. Quimiocinas liberadas pelos mastócitos e outros tipos de células promovem recrutamento direto de células inflamatórias que contribuem para a LAR, que é caracterizada pelo influxo de eosinófilos e células Th2. Os eosinófilos liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo cisteinil leucotrienos e proteínas básicas (proteínas catiônicas, peroxidase eosinofílica – EPO e neurotoxina derivada de eosinófilos), que podem ser uma fonte importante de interleucina-3 (IL-3), IL-5, IL-13 e fator estimulador de granulócitos/macrófagos. Neuropeptídeos também parecem contribuir para a fisiopatogenia dos sintomas alérgicos

O papel pró-inflamatório do eosinófilo na asma está relacionado a produção de cisteinil leucotrienos, bem como citocinas Th1 (interferon- γ e IL-2) e citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (Akuthota et al., 2010). A relação dos eosinófilos com a hiperresponsividade brônquica (Lee et al., 2004, Haldar et al., 2009), possivelmente ocorre devido a produção de IL-13, de cisteinil leucotrienos e a liberação da proteína básica principal e a proteína catiônica eosinofílica pelos seus grânulos, a qual causam dano ao epitélio e perpetuam a inflamação das vias aéreas. Além disso, os eosinófilos contribuem para ativação e proliferação de células T em tecido humano e também em modelo experimental de asma (Akuthota et al., 2010).

Na última década foi identificada uma resposta imune das células Th1 associada a inflamação neutrofílica em pacientes com asma grave (Falcai et al., 2015). A sua capacidade de secretar TNF- α e IFN- γ poderá explicar, em parte, o dano tecidual associado às formas mais graves da doença (Truyen et al., 2006). Pacientes com asma grave com inflamação granulocítica mista exibem níveis aumentados de TNF α e IL-17 (Magnan et al., 2000, Hansbro et al., 2011). Estes níveis aumentados de TNF α sugere que as células Th1 mediam inflamação dos neutrófilos (Berry et al., 2006; Vroman et al., 2015).

As quimiocinas desempenham uma função muito importante na patogênese da asma, e estão envolvidas com o processo de quimiotaxia de leucócitos para as vias aéreas. Destaca-se aqui a CCL17 denominada também como TARC (Yang et al., 2017). Pesquisas anteriores relatam que a expressão de CCL17/TARC ocorre em diferentes tipos de células (Imai et al., 1997; Imai et al., 1999; Lloyd et al., 2000). Contudo, a produção dessa quimiocina pelo epitélio das vias aéreas se faz particularmente importante devido ao seu potencial quimiotático para linfócitos Th2, que são as células responsáveis pelo padrão de resposta inflamatória na asma (Yang et al., 2017).

Outro subtipo de células T, as células Th17, parece ter um importante papel em doenças inflamatórias e autoimunes (Roussel et al., 2010; Halwani et al., 2013). Apesar de pouco se saber acerca do papel destas células na

asma, foi demonstrado, por alguns autores, que os níveis de IL-17A e a IL17F estão aumentados nos pulmões de pacientes asmáticos e que esses níveis estão relacionados com a gravidade da doença (Lloyd; Hessel, 2010; Kudo et al., 2012; Busse et al., 2013). Assim, as células Th17 parecem contribuir de uma forma significativa para a doença, o que é corroborado pelo fato de se verificar que a IL-17A e a IL-17F potenciam a ativação de fibroblastos, células epiteliais e de células do músculo liso das vias aéreas, bem como a produção de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento associados à inflamação neutrofílica (Busse et al., 2013; Al-Muhsen et al., 2013).

1.2 CITOCINAS IL-17

As citocinas exercem função primordial em orquestrar a inflamação das vias aéreas e mudanças estruturais do trato respiratório na asma, sendo importantes alvos para o desenvolvimento de modalidades terapêuticas para a doença. Portanto, a descoberta de uma citocina pode fornecer oportunidades de controle da doença (Park; Lee, 2010).

Embora a asma seja considerada uma doença alérgica de perfil inflamatório clássico Th2, algumas citocinas emergentes, dentre elas, IL-17 vem sendo estudadas para melhor compreensão da fisiopatologia dessa doença, uma vez que 5 a 10% dos pacientes asmáticos, caracterizados como portadores de asma grave, manifestam diferentes padrões de inflamação de vias aéreas que não podem ser explicados apenas pela resposta imune Th2 (Barnes, 2013; Übel et al., 2014, Wang et al., 2015).

A citocina IL17 faz parte de uma família de citocinas compostas por sete membros (IL-17 ou IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-25, IL-17F, e o homólogo viral vIL-17 ou ORF13) e desempenha funções na imunidade contra fungos e bactérias extracelulares (Fajt et al., 2016), além de exibir maior produção de IL-17A e IL-17F que são altamente pró

inflamatórias e agravam a resposta inflamatória neutrofílica subjacente (Wegmann et al., 2011; Way et al., 2013).

Portadores de asma grave apresentam exacerbações graves frequentes, apesar de elevadas doses de corticosteroides inalados ou a necessidade de corticosteroides orais muitas vezes associado a β_2 agonistas de ação prolongada (LABA), antagonistas dos receptores de leucotrienos ou teofilina (Chung et al., 2014). Sabe-se também que o aumento das células IL-17 pode estar correlacionado com o recrutamento eosinofílico e neutrofílico em modelo de asma (Choy et al., 2015). Trabalhos tem mostrado que as células de perfil Th17 são potentes indutores da resposta inflamatória tecidual, sendo um fator determinante da asma grave (Kudo et al., 2012; Way et al., 2013).

A citocina IL-17 promove eosinofilia nas vias aéreas por meio da indução de quimiocinas (CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2), CXCL5 (LIX), CXCL8 (IL-8), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), e CCL20 (MIP3 α) e fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF e TNF- α) (Alcorn et al., 2010; Zhao et al., 2011). As citocinas IL-17 também parecem contribuir para o remodelamento das vias aéreas na asma, sugerindo que o bloqueio desta via pode ajudar no controle da fibrose (Al-Muhsen et al., 2013). Também já foi demonstrado que o equilíbrio entre IL-25, IL-13 e IL-17 é responsável pela regulação das respostas tipo 2 durante a inflamação alérgica pulmonar (Barlow et al., 2011).

Além disso, especialmente a IL-17A, mas não a IL-17 F ou a IL-22, pode contribuir para a asma alérgica por aumentar diretamente as respostas contráteis das células do músculo liso das vias aéreas por meio de uma via que envolve a ativação de NF κ B e indução da expressão de RhoA e ROCK2 (Kudo et al., 2012). Assim, IL-17A, NF κ B e efetores dessa via podem ser atrativos alvos terapêuticos para o tratamento da inflamação pulmonar (Kudo et al., 2012).

Além da relação entre as células Th17 com as alterações relacionadas à inflamação alérgica pulmonar em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, já foi demonstrado anteriormente que indivíduos portadores de asma grave de difícil controle apresentam elevação da IL-17 em suas vias aéreas. Esta elevação esteve correlacionada com aumento da infiltração de neutrófilos, produção de quimiocinas e grau de hiperresponsividade (Wang; Wills-Karp, 2011; Barnes et al., 2013; Übel et al., 2014, Wang et al., 2015).

Entretanto, ainda existem muitas controvérsias relacionadas às funções da IL-17 nos pulmões, Hellings et al. (2003), por exemplo, demonstraram que a IL-17 orchestra o influxo de granulócitos dependente das células T para as vias aéreas na inflamação. Esses achados mostraram que a administração de anticorpo monoclonal anti-IL-17 antes do desafio reduz fortemente o influxo de neutrófilos para as vias aéreas no modelo de inflamação alérgica crônica. Por outro lado, o uso de anti-IL-17 aumenta o influxo de eosinófilos para os pulmões, provavelmente por aumentar a produção de IL-5. Neste estudo, o tratamento com anti-IL-17 também não afetou a hiper-reatividade brônquica.

De forma semelhante, Schnyder-Candrian et al. (2006) atentaram para uma possível dupla função da IL-17. Dependendo do contexto, essa citocina seria capaz de exacerbar ou inibir a asma. Foi observado que a IL-17 é necessária para o desenvolvimento de asma alérgica, sendo fundamental no recrutamento de granulócitos, especialmente eosinófilos, nesta fase. Por outro lado, o tratamento com IL-17 inibiu a hiperresponsividade ao desafio com alérgeno e reduziu o influxo de eosinófilos. Já o uso de anticorpo anti-IL-17 aumentou a resposta alérgica, incluindo o aumento da infiltração de eosinófilos e hiper-reatividade brônquica.

É importante ressaltar que, no caso dos pulmões, existem mecanismos envolvidos que devem ser levados em consideração para a inibição de citocinas. Nesse contexto, Proust et al. (2002) observaram que o uso de anti-IL-5 por via intranasal foi capaz de neutralizar essa citocina no

lavado broncoalveolar, mas não no soro, e vice-versa, sendo a neutralização total da IL-5 obtida com a administração concomitante de anticorpo por via intranasal e intravenosa. Isso pode explicar os resultados antagônicos observados nos diferentes estudos no que se refere a IL-17.

Além disso, algumas evidências apontam para o fato de que qualquer tratamento envolvendo bloqueio de células Th17 ou IL-17A pode aumentar a vulnerabilidade a infecções, uma vez que esta linhagem de células participa da defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares e extracelulares (Aujla; Alcorn, 2010). Além de participar da defesa do organismo contra vírus, fungos e bactérias a IL-17 também atua indiretamente nesta defesa, por intermédio do recrutamento de neutrófilos (Alcorn et al., 2010; Mintz-Cole et al., 2012) confirmaram que a neutralização da IL-17 resultou em aumento da hiperreatividade das vias aéreas e infiltração eosinofílica após exposição ao *Aspergillus versicolor*, um fungo comumente associado com a indução da asma. Estes resultados ressaltam o fator protetor da IL-17 contra o desenvolvimento de asma após a exposição fúngica.

Por estes vários motivos, ainda existem muitas controvérsias em relação a real participação das células Th17 na fisiopatogenia da asma. Assim, estudos são necessários para descobrir se a IL-17 pode ser um alvo seguro para o tratamento desta doença (Aujla; Alcorn, 2010). De qualquer modo, devido ao importante envolvimento das células Th17 no desenvolvimento da inflamação alérgica, estratégias terapêuticas inibindo estas células devem ser consideradas como nova abordagem para o tratamento da asma grave de difícil controle (Besnard et al., 2012).

Recentemente, foi descrito que a inibição da IL-17 contribuiu para o controle da inflamação Th1/Th2/Th17, expressão de quimiocinas, remodelamento da matriz extracelular e estresse oxidativo no parênquima pulmonar em modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS (Camargo et al., 2018).

1.3 QUIMIOCINAS TARC E EOTAXINA

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular (8-12 kDa) com, aproximadamente, 70 a 80 aminoácidos de comprimento (Charo; Ransohoff, 2006). Existem mais de 50 quimiocinas, sendo que todas têm estruturas terciárias similares, que consistem em um terminal amina (que atua como domínio de sinalização), seguido de uma longa alça (que contém importantes determinantes de ligação), três folhas β e uma hélice C-terminal. A maioria das quimiocinas tem quatro cisteínas conservadas (Griffith et al., 2014).

De acordo com o número e espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade N-terminal, são classificadas em quatro subfamílias: CXC, CC, CX3C e C, onde C representa cisteína e X ou X3 representa um ou três aminoácidos 1,3,4 e também podem ser representadas pelas letras do alfabeto grego α , β , γ e δ (De Filippo et al., 2013). Os receptores das quimiocinas pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteínas G, e ainda que reconheçam mais do que uma quimiocina, os receptores estão praticamente sempre restritos a uma única subfamília (Griffith et al., 2014).

A subfamília CC representa quimiocinas que ativam monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos, sendo importantes moduladoras dos processos de inflamação crônica e alérgica (De Filippo et al., 2013). Dentre as quimiocinas da família CC a TARC pode ser produzida por monócitos principalmente estimulados por citocinas de perfil TH2 ou pelas células dendríticas (Lloyd et al., 2000; Abelius et al., 2011; Holgate, 2012), sendo assim também exerce modulação dos processos inflamatórios alérgicos.

Outra quimiocina moduladora da resposta alérgica e com habilidade para recrutar eosinófilos é a eotaxina. Em asmáticos, a eotaxina é produzida em elevados níveis (Hong et al., 2016), particularmente por células epiteliais das vias aéreas, que contribuiu para que eosinófilos migrem até essa região,

degranulem e liberem suas proteínas que contribuem entre outras ações para a lesão do epitélio (Lukacs et al., 1999).

Além do recrutamento e ativação dos eosinófilos, a eotaxina pode ter efeito sobre outras células, com, por exemplo, basófilos que sofrem degranulação na presença da eotaxina e célula tipo Th-2 que podem sofrer migração (Lloyd et al., 2000).

1.4 REMODELAMENTO

Além da inflamação eosinofílica das vias aéreas, as características fisiopatológicas da asma incluem mudanças estruturais conceituadas como remodelamento (Sagiani; Lloyd, 2015). Essas alterações consistem em aumento da espessura da membrana basal reticular subepitelial (RBM), aumento da espessura do músculo liso das vias aéreas (ASM), angiogênese e hiperplasia de células caliciformes que estão associados a uma perda irreversível da função pulmonar (Tai et al., 2014) (Figura 5).

Fonte: Adaptado de *Journal of Internal Medicine*, 2016;279:192-204.

Figura 5 - Processo de remodelamento das vias aéreas, Mecanismos fisiopatológicos na asma ilustrados pelas interações entre células inflamatórias e o ambiente externo. A importância das células tipo T helper 2 (Th2) é demonstrado pela contribuição de citocinas Th2 IL-4, IL-5 e IL-13 a inflamação eosinofílica e produção de IgE. Célula inata linfóide tipo 2 (ILC-2) podem também contribuir para a produção de IL-5 e IL-13 e as células Th1 e Th17 a uma inflamação mais neutrofílica. Remodelamento da parede das vias aéreas e reparação também são processos importantes que podem ser acionados por citocinas Th2, bem como por fatores de crescimento e citocinas derivadas a partir de células epiteliais e de macrófagos.

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

Pacientes com asma grave apresentam alterações estruturais de remodelamento e podem ter a função pulmonar comprometida (Elias, 2004). Os principais achados histopatológicos em pacientes asmáticos com remodelamento são a diminuição da luz das vias aéreas por fibrose subepitelial, aumento da espessura do músculo liso da via aérea e hiperplasia de células produtoras de muco (Kaminska et al., 2009; Shifreen et al., 2012).

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

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

Há evidências que a porção distal do pulmão contribui para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (Yanai et al., 1992;

Wagner et al., 1998). Previamente achava-se que esta região, antes conhecida como “zona silenciosa”, contribuiria somente com 10% do valor total de resistência ao fluxo aéreo pulmonar. Entretanto, as novas tecnologias permitiram demonstrar que há alterações estruturais e inflamatórias no parênquima pulmonar distal que são similares às observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Minshal et al., 1998; Lanças et al., 2006).

É importante considerar que o volume total e a área de superfície das vias aéreas distais são muito maiores que o volume e a área de superfície das grandes vias aéreas, sugerindo que o desenvolvimento de qualquer alteração no pulmão distal em pacientes asmáticos tem um efeito mais dramático sobre a patogênese e o tratamento da asma (Tulic; Hamid, 2003).

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

A espessura da membrana basal reticular na asma é determinada pela proporção de deposição em curso e degradação de proteínas, incluindo colágeno I, III e V, fibronectina, tenascina, lumican e biglican (Redington et al., 1997). Esses componentes são provavelmente secretados pela ativação de fibroblastos e miofibroblastos, principalmente por causa da sinalização do TGF- β (Michalik et al., 2009). As fibras colágenas são os elementos mais abundantes da matriz extracelular no pulmão, constituindo aproximadamente 70% do interstício pulmonar (Chu et al., 1998). Qualquer alteração na estrutura, quantidade ou na geometria de sua distribuição, pode desencadear alterações na função pulmonar (Boulet, 2018).

Os proteoglicanos decorina, biglicano e lumican desempenham um papel importante na interação das fibrilas de colágeno entre si e com outros componentes da matriz extracelular (Grover et al., 1995). Biglicano e decorina são proteoglicanos envolvidos na estabilização de fibrogênese de colágeno no tecido (Kalamajski et al., 2010). Relatos sugerem que a decorina tem um papel protetor na fibrose hepática por (Baghy et al., 2012). Neste aspecto, pode-se especular que o aumento da expressão de decorina em pacientes com asma grave pode ser um mecanismo de proteção para modular a remodelamento pulmonar. Por outro lado, uma quantidade aumentada de decorina poderia regular o estabilizar o espaçamento e criar uma matriz de colágeno mais rígida, que pode afetar a elasticidade geral do tecido pulmonar (Weitof et al., 2014).

Quanto à fibronectina também desempenha um papel importante na durante o desenvolvimento pulmonar, Na vida adulta pode estar alterada após lesão e inflamação tecidual ocasionando maior ativação de fibroblastos e macrófagos alveolares (Hocking, 2002). Na asma, os níveis de fibronectina, juntamente com o colágeno I e III, estão aumentados no músculo liso da parede das vias aéreas (Araujo et al., 2008). Outras anormalidades na deposição na estrutura da matriz das vias aéreas na asma incluem um aumento específico da isoforma lumican que também está associada a lesão tecidual e com a gravidade da asma (Stuart et al., 2000).

Os principais componentes da matriz extracelular pulmonar são as fibras elásticas, colágenas, os proteoglicanos, as glicoproteínas e as metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMPs) (Holgate, 2000; Manuyakorn et al., 2013). Os macrófagos produzem citocinas, elastase e metaloproteases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que podem degradar componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios, potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (Tillie-Leblond et al., 2005).

As metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores teciduais (TIMPs), em situações de desequilíbrio contribuem para o dano tecidual e algumas

das características do remodelamento observadas na asma (Vignola et al., 2003). São produzidas por células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Katarzyna et al., 2016) e tem relação com citocinas Th2 e também com Th17 (Chesn et al., 2014).

No trato respiratório o óxido nítrico (NO) é produzido por uma ampla variedade de células, incluindo células epiteliais, nervos, células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e mastócitos) e células endoteliais vasculares (Ricciardolo, 2003). Uma vez produzido, o NO difunde-se rapidamente do local de síntese, permeando membranas celulares, e interage com os sítios moleculares intracelulares (Ricciardolo, 2003). O óxido nítrico é uma molécula de gás altamente reativa. É um radical livre que reage com outras moléculas como o oxigênio, radicais superóxido ou metais de transição.

As óxido nítrico sintases (NOS) são as enzimas responsáveis por catalisar a formação de óxido nítrico através da conversão enzimática do aminoácido arginina em citrulina (Chapman et al., 2001). O NO é endogenamente sintetizado por uma de três isoformas de NOS, com diferentes atividades, sendo duas constitutivas (eNOS, derivada do endotélio; e nNOS, derivada dos neurônios) e uma NOS induzida (iNOS) (Chapman et al., 2001; Rodway et al., 2009). As isoformas constitutivas estão envolvidas na vasodilatação e broncodilatação. A produção de iNOS é estimulada por muitas citocinas pró-inflamatórias e é expressa em alguns tipos de células inflamatórias (Ricciardolo et al., 2004; Prado et al., 2005b).

O NO parece atuar em vários mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam as alterações funcionais e histopatológicas encontradas em pacientes com doenças inflamatórias pulmonares, sendo que a sua contribuição depende principalmente da enzima pela qual foi produzido. Tufvesson et al., (2017) sugere que o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico na asma por causar relaxamento na musculatura lisa brônquica, sendo presente nos nervos do sistema NANC. No entanto, o NO derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação nas arteríolas,

com consequente extravasamento de plasma e edema. A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS pode resultar em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento da secreção do muco e ativação indireta de células Th1/Th2 contribuindo para os sinais e sintomas da doença,

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

Vários estudos de nosso grupo de pesquisa já demonstraram associação entre inflamação pulmonar alérgica crônica e aumento de óxido nítrico exalado e da expressão de iNOS (tanto em vias aéreas quanto parênquima pulmonar) no modelo de asma experimental em cobaias (Angeli et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Ruiz-Schütz et al., 2008; Starling et al., 2009; Prado et al., 2011; Marques et al., 2012; Possa et al., 2012).

O NO pode também ser convertido em nitrato, capaz de oxidar proteínas e contribuir para o estresse oxidativo, Isto pode ocorrer por intermédio da nitração da tirosina, em uma reação catalizada pela peroxidase eosinofílica (Wu et al., 1998). Elevados níveis de nitrotirosina foram observados em asmáticos (Hanazawa et al., 2000). Quantidades excessivas de ROS (espécies reativas de oxigênio) RNS (espécies reativas

de nitrogênio), que são produzidas pelos asmáticos podem exceder as defesas antioxidantes e causar estresse oxidativo (Hanazawa et al., 2000). Além disso, ROS pode induzir a produção de citocinas e quimiocinas por intermédio da produção do fator nuclear NF- κ B, em células epiteliais brônquicas (Biaglioli et al., 1999).

Nas vias aéreas, as respostas associadas ao estresse oxidativo podem modular a contração da musculatura lisa (Rhoden et al., 1989), a indução da hiperresponsividade de vias aéreas (Katsumata et al., 1990), a hipersecreção brônquica (Doelman et al., 1990), a lesão epitelial e a exsudação vascular (Del Maestro et al., 1981), apresentando um importante papel na fisiopatologia da asma (Doelman et al., 1990). O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação lipídica da membrana celular, responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos (Morrow, 2006).

Estudos clínicos (Lara et al., 2008; North et al., 2009; Vonk et al., 2010) e experimentais (Meurs et al., 2000; Zimmermann et al., 2003; Maarsingh et al., 2009a, b, 2011; Aristóteles et al., 2013; Pera et al., 2014) revelam um papel importante da arginase na fisiopatologia da asma. Classicamente, a arginase é a enzima que atua no ciclo hepático da uréia. No entanto, já foi observada em outras células do organismo que não expressam um ciclo completo da uréia, incluindo o pulmão (Que et al., 1998; Meurs et al., 2003).

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 (Morris et al., 1998). 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 (Morris et al., 1998).

Já no início dos anos oitenta, o aumento da atividade da arginase foi encontrada no escarro de pacientes asmáticos (Kochanski et al., 1980). Aumento da expressão de arginase I nas vias aéreas de pacientes asmáticos foi descrita pela primeira vez por Zimmermann et al. (2003). Os autores encontraram aumento do número de células com expressão de arginase 1, presumivelmente macrófagos, no lavado bronquio 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. Enquanto a melhora dos sintomas destes pacientes, foi associada a um declínio na atividade da arginase e um aumento nas concentrações de L-arginina (Morris et al., 2004).

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 da arginase tipo 1 e 2 é regulada por uma gama de estímulos, incluindo citocinas derivadas dos linfócitos Th2, tais como IL4 e IL10 e IL13, e aumento de estímulos cAMP, tal como PGE2 (Zimmermann et al., 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 fisiopatogenia da asma, particularmente relacionado ao recrutamento de

células inflamatórias (Leick-Maldonado et al., 2004; Prado et al., 2011), à hiperresponsividade das vias aéreas (Meurs et al., 2002), e ao processo de remodelamento (Ricciardolo, 2003, Ricciardolo et al., 2004; Prado et al., 2005a).

A Figura 6 esquematiza o complexo óxido nítrico e arginase, L-arginina é catalisada tanto pelas óxido nítrico sintases, como pela arginase. Arginase produz L-ornitina e uréia que podem atuar em vários órgãos. Em contraste, o óxido nítrico pode ser produzido por ambas óxido nítrico sintase: constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS), e tem um papel fisiopatológico importante na saúde e doenças por meio dos efeitos diretos ou indiretos sobre a modulação da resposta de estresse oxidativo. Assim, arginase regula a produção de NO e concorre pelo mesmo substrato.

Fonte: Modificado de Ricciardolo et al., 2004.

Figura 6 - Esquema demonstrativo das vias de produção de óxido nítrico e arginase

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 ao estresse oxidativo desencadeado pelo contato com 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 (Ricciardolo et al., 2004).

Após exposição ao estresse oxidativo, 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).

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 (Voynow; Kummarapurugu, 2011). 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 também das reações inflamatórias. A produção destes radicais por neutrófilos parece estar aumentada em pacientes asmáticos (Wood et al., 2003).

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., 2006).

Os isoprostanos possuem uma potente atividade biológica e geralmente mediam 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; 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-2a), 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-2a um dos membros mais característicos da classe F2-isoprostano (Morrow et al., 2006).

A atividade biológica do 8-iso-PGF-2a 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).

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 definidos em humanos saudáveis (Famm; Morrow, 2003; Milne et al., 2008). 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 destes agravos.

As evidências de que a inflamação, que é característica da asma, resulta em aumento do estresse oxidativo nas vias aéreas, vêm se tornando cada vez maiores (Dworski, 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). 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). Muitos estudos em modelos animais sugerem que ROS podem contribuir com a hiperresponsividade brônquica pelo aumento do tônus vagal devido ao dano dos receptores β -adrenérgicos sensíveis aos oxidantes e pela diminuição do *clearance* mucociliar. Desta forma, aspectos do sistema de defesa antioxidante, 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.

Estudos têm demonstrado elevada peroxidação lipídica na asma, mensurada pelo 8-epi-PGF2a, 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 de isoprostanos no lavado broncoalveolar e na urina após desafio com alérgeno representa uma evidência de que, na asma induzida por alérgenos, as ROS e a peroxidação lipídica tem papel fisiopatológico significativo. Além disso, 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).

Tem sido sugerido que os isoprostanos possam atuar como potentes constritores do músculo liso (Kawikova et al., 1996). Além disso, são produzidos no tecido das vias aéreas e podem contribuir com os efeitos físicos observados durante a resposta tardia na asma, existindo relação da gravidade da doença com a concentração de 8-iso-PGF_{2a} no condensado de ar exalado (Montuschi et al., 1999).

De fato, alguns estudos sugerem a existência de correlação entre asma e a hiperresponsividade das vias aéreas (HRVA) (Litonjua et al., 2002; Rao, 2016). Entretanto, há variabilidade considerável na intensidade da HRVA nos pacientes com asma, e o nível de HRVA é variável tanto entre os pacientes, sendo que graus elevados de hiperresponsividade são normalmente proporcionais à gravidade da asma subjacente, o que está associado ao aumento da resistência das vias aéreas e diminuição do fluxo aéreo (Cockcroft; Davis, 2006; Busse, 2010).

Em modelos humanos o desafio com metacolina é amplamente utilizado para avaliar e quantificar a HRVA (Cockcroft, 2010). Estudos relatam que essas alterações mecânicas são resultados de alterações do músculo liso das vias aéreas que podem envolver a IL-17A (Chang et al., 2012; Yeganeh et al., 2013; Dragon et al., 2014).

A contração do músculo liso induzida por agonistas é uma das características da asma, contribuindo para a resistência ao fluxo aéreo. O tônus da musculatura lisa é primariamente regulado pelo nível de fosforilação da cadeia leve da miosina (CLM) por mecanismos dependentes e independentes de cálcio (Ca²⁺). Um aumento na concentração intracelular de Ca²⁺, decorrente da ativação dos canais de cálcio na membrana plasmática e/ou liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático, leva à formação do complexo Ca²⁺-calmodulina, resultando na ativação da miosinoquinase. Esta enzima fosforiza a CLM, resultando em contração da

musculatura lisa por ligação entre a actina e a miosina (Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010). Como os filamentos de actina e miosina estão ancorados ao citoesqueleto e membrana plasmática por estruturas conhecidas como corpos densos e placas densas, o miócito se contrai (Chiba et al., 2010) (Figura 7).

Fonte: Modificado de Hilgers e Weeb, 2005.

Figura 7 - Vias de sinalização molecular envolvidas na contração das células musculares lisas induzidas por agonista. A resposta contrátil é iniciada por um rápido e transiente aumento da concentração de cálcio intracelular seguida pela interação cálcio calmodulina para estimular a fosforilação da cadeia leve de miosina.

A extensão da contração é determinada pelo equilíbrio da atividade entre a miosinoquinase e a miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006). Esta sequência de eventos prediz que o tônus da musculatura lisa deveria ser proporcional à concentração de Ca^{2+} citosólico. Entretanto, na presença de uma concentração fixa de Ca^{2+} , agonistas broncoconstritores também podem elevar a fosforilação da CLM. Além disso, a inibição da miosinofosfatase, que efetivamente aumenta a fosforilação da CLM, pode ocorrer com uma concentração fixa de cálcio citoplasmático. Ou seja, às

vezes o nível de Ca^{2+} nem sempre corresponde ao grau de fosforilação da cadeia leve da miosina e de contração do músculo liso, sendo que o nível de contração é maior do que seria esperado para um dado nível de Ca^{2+} .

Os mecanismos independentes de Ca^{2+} para a fosforilação da CLM e contração do músculo liso são conhecidos como sensibilização do Ca^{2+} (Sylvester, 2004) (Figura 8). Os mecanismos responsáveis pela sensibilização do Ca^{2+} ainda não foram completamente elucidados, mas sabe-se que uma das principais vias envolvidas neste processo é a via RhoA/Rho quinase (Schaafsma et al., 2006; Chiba et al., 2010).

Fonte: Modificado de (Hilgers; Weeb, 2005).

Figura 8 - Mecanismo de sensibilização ao cálcio e contração no músculo liso. A contração no músculo liso também pode ser controlada por um mecanismo independente de cálcio envolvendo ligação a um receptor acoplado a proteína G. Quando agonistas se ligam ao receptor pela parte externa da membrana do músculo liso, a Rho-GTP é ativada pelo fator de troca do nucleotídeo Rhoguanina.

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

A atividade da Rho é regulada por três grupos de proteínas: proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que facilitam a inativação da forma GTP ativa pelo aumento da atividade intrínseca da GTPase na Rho; inibidores de dissociação de GTPase (GDIs), que inibem algumas GTPases da família Rho por ligação a membranas e previnem a dissociação e portanto a ativação de nucleotídeos; e fatores de troca guanina nucleotídeo específico para Rho (Rho GEFs), que facilitam a ativação da Rho por promover a dissociação de GDP e subsequentemente ligação de GTP. As Rho GEFs são consideradas os principais reguladores da atividade da Rho. A atividade da Rho também pode ser regulada por numerosos receptores de proteína G (Fernandes et al., 2007).

A Rho quinase ativada interfere com o equilíbrio entre as atividades da miosinoquinase e a miosinofosfatase, fosforilando e consequentemente inativando a subunidade de ligação da miosinofosfatase (Schaafsma et al., 2006). Como a miosinofosfatase remove fosfato da CLM fosforilada para induzir o relaxamento muscular (Chiba et al., 2010), a inibição de sua atividade pela Rho quinase promove o estado fosforilado da CLM e contribui para um aumentado nível de contração (Schaafsma et al., 2004; Chiba et al., 2010; Possa et al., 2012; Righetti et al., 2014).

A citocina IL-17 também estar envolvida na hiperresponsividade (AHR) pulmonar por afetar diretamente as células epiteliais das vias respiratórias, fibroblastos e células do músculo liso (Agache et al., 2010,

Kudo et al., 2012), Kudo et al. (2012) relataram em um estudo com camundongos e em humanos que a IL-17 pode afetar diretamente o músculo liso das vias aéreas por uma atenuação da resposta contrátil, e com isso o surgimento da AHR. De fato, a citocina IL-17 vem sendo, há muito tempo, identificada como um dos principais agentes causadores da hiperresponsividade das vias respiratórias.

1.5 SISTEMA COLINÉRGICO ANTI-INFLAMATÓRIO

A magnitude da resposta inflamatória é controlada e autorregulada por uma série de mecanismos, dentre eles as interações do sistema nervoso central e imune que são fundamentais para a modulação da resposta imune inata frente ao processo inflamatório (Gallowitsch-Puerta; Pavlov, 2007).

O papel do SNS na modulação dos processos inflamatórios já é bem definido e tem funções pró ou antiinflamatórias, dependendo de fatores como a concentração de neurotransmissores, a afinidade do receptor, tempo de atividade do SNS em relação ao curso da inflamação e outros (Straub et al., 2006).

De modo contrário ao papel bem definido do SNS na doença, o controle parassimpático da inflamação, só foi descrito em 2000 por (Borovikova et al., 2000), que descreve o arco reflexo da inflamação como responsável por transmitir informações sobre o estado imunológico da periferia para o sistema nervoso central com a finalidade de regular a inflamação, evidenciando a comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e imunitário.

O arco reflexo da inflamação consiste em uma via neural aferente sensorial que detecta os produtos moleculares da lesão, infecção e inflamação, e um arco neural motor eferente que transmite os sinais para modular as respostas imunes. Especificamente ao arco eferente do reflexo

inflamatório é o que denominamos de via colinérgica anti-inflamatória, um mecanismo neural composto pelo nervo vago parassimpático e seu principal neurotransmissor a acetilcolina (ACh) (Hasko; Szabo, 1998, Straub et al., 2006).

Quimicamente a ACh é um éster de ácido acético e colina, cuja simplicidade estrutural subestima a complexidade das ações que exerce (Richardson, 1979). A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal pré-sináptico de neurônios colinérgicos a partir da colina e da acetil-coenzima. A (acetil-CoA) derivada do metabolismo mitocondrial, sendo que essa reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) (Ribeiro et al., 2006).

O suprimento de colina é provido pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1), responsável pela recaptação da colina para o terminal pré-sináptico, sendo este um importante requisito para a manutenção da síntese de acetilcolina (Ribeiro et al., 2006). Um suprimento constante e suficiente de colina nas terminações nervosas colinérgicas pode manter altos níveis de síntese e liberação de acetilcolina por um tempo prolongado (Prado et al., 2002, Ribeiro et al., 2006).

Dado o seu caráter catiônico, a ACh não se difunde de forma efetiva pelas membranas celulares, portanto se faz necessário um mecanismo de transporte para que essa molécula seja liberada para a fenda sináptica (Prado et al., 2013). Dessa forma, após a síntese, a acetilcolina é armazenada dentro de vesículas sinápticas através do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT).

O VACHT é uma glicoproteína de vesículas sinápticas que apresenta 12 domínios transmembrana e possui homologia com os transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs) (Alfonso e cols., 1993) (Figura 9).

Fonte: Modificado de Roghani e cols., 1994.

Figura 9 - Topologia e a sequência de aminoácidos do transportador vesicular de acetilcolina de rato. A proteína do VACHT contém doze domínios transmembranas (IXII) sendo a porção amino e carboxi-terminal voltada para o citoplasma dos neurônios. Em vermelho estão destacados os aminoácidos conservados entre os transportadores vesiculares, em azul são apresentados os resíduos exclusivos da proteína do VACHT. Os resíduos destacados em preto indicam os resíduos de ácido aspártico que são comuns a todos os transportadores vesiculares. Entre os domínios transmembranas I e II, observa-se o sítio de fosforilação

A ACh é liberada pelo SNA nas fibras pré e pós-ganglionares do sistema nervoso colinérgico (Richardson, 1979). Assim, a acetilcolina que foi liberada via exocitose de vesículas, após um curto intervalo de tempo, é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (Prado et al., 2013). Essa hidrólise promoverá a dissociação da colina do acetato, sendo a colina recaptada para o terminal pré-sináptico por meio de transporte ativo, para ser utilizada na síntese de novas moléculas de acetilcolina. Ao ser liberada a ACh interage com duas classes principais de receptores de acetilcolina (AChR): Receptores nicotínico de acetilcolina (nAChRs) e os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) (Prado et al., 2013). É

importante ressaltar que as funções da ACh serão determinadas dependendo da interação com o seu respectivo receptor (Figura 10).

Fonte: The American Psychiatric Publishing – Textbook of Psychopharmacology, fourth edition, Edited by Alan F. Schatzberg and Charles B. Nemeroff, 2009.

Figura 10 - Síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina. A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal nervoso, através da colina e da Acetil-CoA, este derivado do metabolismo mitocondrial. A reação de síntese da acetilcolina é promovida pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT). Após sua formação, a ACh é transportada para dentro de vesículas sinápticas através do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT). Após a despolarização do terminal nervoso e consequente liberação e exocitose de ACh, este neurotransmissor se ligará a receptores específicos na membrana pós-sináptica, desencadeando por exemplo, a contração muscular esquelética. Após sua ação, a ACh é degradada pela acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina. A colina por sua vez é recaptada para o interior do terminal nervoso através de seu transportador de colina de alta afinidade (CHT) sendo reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh

Dados na literatura enfatizam a importância do papel pró-inflamatório da acetilcolina na mediação da quimiotaxia celular (Rosas-Ballina et al., 2011; Kistemaker et al., 2012; Gori et al., 2017) e a inibição da produção de citocinas, o que ajuda a interferir no estado contínuo de inflamação (Arvidsson et al., 1997). O armazenamento de ACh em vesículas sinápticas está fortemente relacionado à atividade do transportador de acetilcolina vesicular (VACHT). No entanto, ainda não está claro se a inflamação pulmonar é regulada pelos níveis de VACHT (Prado et al., 2013). Neste contexto, Pinheiro et al. (2015) mostraram que o VACHT é essencial para manter a homeostase pulmonar e regula as vias NF-KB e JAK-STAT nos pulmões.

1.6 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB

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

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

No entanto, a família do NF- κ B consiste de cinco subunidades, caracterizada por conter uma porção N – terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (RHD – *Rel homology domain*), a qual se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra denominada de domínio de dimerização. Nesta última encontra-se um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal se difere entre cada subunidade, sendo que p65, c-Rel e RelB contém um domínio de transativação (TAD), necessária para iniciar a atividade transcricional (O`Neil, 1997).

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

Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF- κ B. Quando não estimulado, o fator NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B (Figura 11) são necessárias para que ocorra a translocação (Tripathi; Aggarwal, 2006).

Fonte: Modificado de Xiao, 2004

Figura 11 - Esquema representativo demonstrando a translocação do NF-κB para o núcleo

1.7 MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA PULMONAR E DE EXARCEBAÇÃO PELO LPS

Os modelos experimentais contribuem com importantes informações a respeito da fisiopatologia da asma e permitem a elaboração de novas estratégias terapêuticas. A abordagem geral envolve a sensibilização de camundongos por injeção intraperitoneal de alérgeno (sensibilização ativa e sistêmica) ou exposição local, normalmente em combinação com um material adjuvante como o Hidróxido de Alumínio – Alumen (Al[OH]₃). Nestes modelos, há uma resposta inflamatória eosinofílica característica que é dependente do envolvimento de citocinas de perfil Th2 (Prado et al., 2006; Angeli et al., 2008; Arantes-Costa et al., 2008; Possa et al., 2012; Toledo et al., 2013; Righetti et al., 2014).

Após subsequente desafio local (pulmonar) com alérgeno, estes camundongos sensibilizados são estudados para o fenótipo asmático, sendo que apresentam hiperresponsividade das vias aéreas; elevação de imunoglobulina (Ig) sérica, especialmente IgE e IgG; remodelamento, incluindo espessamento da membrana basal, mudanças epiteliais, fibrose subepitelial, aumento de massa muscular lisa, deposição de colágeno; e mudanças vasculares, (Törmänen et al., 2005; Arantes-Costa et al., 2008).

A segunda etapa do nosso estudo foi padronizar um modelo de asma exarcebado. Para tanto, utilizamos o LPS.

O LPS é um glicolípídeo presente na membrana externa de bactérias gram-negativas que é composto por uma bicamada lipídica (lipídio A) e uma cadeia de dissacarídeo (Lowe et al., 2015). Uma das principais fontes do LPS é a partir da bactéria *Escherichia coli* e é utilizado de forma ampla em trabalhos de pesquisa visando entender seus efeitos e os processos inflamatórios que gera, principalmente em estudos imunológicos (Kumari et al., 2015; Venancio et al., 2016).

O mecanismo de ação do LPS inicia-se quando existe no contato com o organismo. Ocorre então uma série de respostas no organismo infectado, sendo que a endotoxina pode ativar células como os monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais, mas sem dúvida, os macrófagos são as principais estruturas onde o mecanismo de ação do LPS é iniciado (Saluk-juszczak; Wachowicz, 2005; Petroni et al., 2015). O LPS liga-se inicialmente às proteínas ligantes do hospedeiro, os LBPs (lipopolisacharyde binding protein), formando um complexo chamado de LPS-LBP, que por sua vez entra em contato com o receptor CD14 dos macrófagos, iniciando a ativação celular (Amiyake, 2003). A partir desta etapa passam a atuar os receptores TLR4 que, com auxílio de outras estruturas como as proteínas MD-2, iniciam a geração do sinal transmembrana. No interior do macrófago ocorrem reações em cascata incluindo a atuação de MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I κ B, AP-1 até a ativação da NF-K κ B, que ativa a síntese de citocinas pró- inflamatórias (Figura 12) (Saluk-juszczak; Wachowicz, 2005).

Ainda, o LPS age por ativar e liberar citocinas pró- inflamatórias dentre elas estão o TNF-alfa (ou fator de necrose tumoral alfa), IL-1 (Interleucina 1) e IL-6 (Interleucina 6) (Belvisi, 2004).

Fonte: Gosh and Hayden, 2008.

Figura 12 - Esquema representativo demonstrando a via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFKB e de outros fatores de transcrição

Estudos demonstram que doses elevadas de LPS provocam lesão pulmonar aguda (Fodor et al., 2015; Abdelmageed et al., 2016). Fodor et al. (2015), utilizando diferentes doses de LPS (3, 5, 10 mg/kg) demonstraram que a gravidade da lesão pulmonar aguda é dose-dependente. Este modelo consiste em duas fases distintas: indução de inflamação alérgica crônica das vias aéreas por exposição à ovalbumina e exacerbação induzida por

instilação intratraqueal baixa dose de LPS (Starkhammar et al., 2012). Havia preocupação na escolha da dose de LPS, para evitar uma lesão pulmonar aguda, utilizaram-se doses baixas de LPS (0,01 mg/ml), uma vez que estudos anteriores demonstraram que a lesão pulmonar aguda ocorre com doses de LPS 50 a 100 vezes maiores (Fodor et al., 2015; Abdelmageed et al., 2016). A intenção de instilação de dose baixa de LPS foi simular a ocorrência de uma infecção como causa de uma exacerbação asmática.

1.8 JUSTIFICATIVA

Os dados anteriormente abordados mostram a relevância de se buscar e avaliar novas opções terapêuticas que possam contribuir para o maior controle dos asmáticos graves, particularmente das exacerbações por infecção. Estudos prévios envolvendo anticorpos anti-IL17 demonstraram a influência potencialmente benéfica destas drogas em alguns aspectos da fisiopatogenia de doenças pulmonares inflamatórias agudas e crônicas. Contudo, nota-se que a influência da IL-17 sobre aspectos como estresse oxidativo e modulação de citocinas inflamatórias ainda não foram estudados em modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica e de exacerbação pelo LPS em dose baixa na tentativa de se aproximar a um modelo de asma associado a exacerbação infecciosa.

OBJETIVOS | 2

2 OBJETIVOS

Neste modelo experimental, o nosso objetivo foi avaliar os efeitos do tratamento com anticorpo neutralizador anti-IL-17 em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica e exacerbados por LPS, caracterizando os seguintes parâmetros:

- A. Hiperresponsividade à metacolina;
- B. Expressão celular de Rho quinase 1 e 2;
- C. Recrutamento eosinofílico, células dendríticas, linfócitos CD4+ e CD8+;
- D. Expressão celular de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-6), anti-inflamatórias (IL-10) e linfocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17); quimiocinas TARC e eotaxina;
- E. Elementos da matriz extracelular: fração de volume de fibras colágenas (tipo I e III), actina, decorina, biglicano, lumican, fibronectina, (TLR3) e expressão celular de MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 e TGF-beta;
- F. Resposta das vias NO-arginase e de estresse oxidativo: células positivas para iNOS, arginase 1, NO exalado e fração de volume isoprostano PGF-2 α ;
- G. Expressão celular de NFkappaB; e
- H. Expressão gênica de VAcHt e IL-17 e arginase 1 por RT PCR.

MÉTODOS | 3

3 MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo nº 109/13).

Foram utilizados 72 camundongos machos BALB/c provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, visto que o protocolo foi repetido duas vezes para permitir a realização de todas as análises. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985). Em média, o peso corporal dos animais foi de aproximadamente 20-25g no início do protocolo de sensibilização. Não houve perda de animais durante o protocolo experimental.

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica:

- 1) **Grupo SAL:** Inalações com soro fisiológico (SF) estéril (n=6);
- 2) **Grupo OVA:** Inalações com solução de ovoalbumina (OVA) (n=6);
- 3) **Grupo SAL + anti-IL17:** Inalações com soro fisiológico e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17 (n=6);
- 4) **Grupo OVA + anti-IL17:** Inalações com solução de OVA e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17 (n=6);

Modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica exarcebada pelo LPS:

- 5) **Grupo OVA + LPS:** Inalações com solução de ovoalbumina e instilação de LPS (n=6);

- 6) **Grupo OVA + LPS + anti-IL17:** Inalações com solução de ovoalbumina, instilação de LPS e tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-17 (n=6).

3.2 PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO COM OVOALBUMINA

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve duração de 29 dias. Os camundongos receberam solução de 50 mg de ovoalbumina (*Sigma - Aldrich*) e 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (*Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S,A,, Rio de Janeiro, Brasil*) em um volume total de 0,2 ml por via intraperitoneal (i,p,) nos dias 1 e 14. Nos dias 22, 24, 26 e 28 os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/ml (1%). O tempo em que os animais ficaram em contato com o aerossol foi de 30 minutos. Ao mesmo tempo, o Grupo Controle recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alumen) (6 mg) por via intraperitoneal (i,p,) e nos dias 22, 24, 26 e 28 foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos. Os estudos de mecânica respiratória e histopatológicos foram realizados vinte e quatro horas (24 horas) após o último desafio antigênico, ou seja, no dia 29 para os animais que receberam a última sensibilização no dia 28 (Arantes-Costa et al., 2008) (Figura 13).

3.3 TRATAMENTO COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-IL17

O anticorpo neutralizante anti-IL17 (R e D Systems, Abingdon, Reino Unido) foi administrado por via intraperitoneal 1 hora antes de cada administração de aerossol nos dias 22, 24, 26 e 28 do protocolo

experimental de asma e 1 hora antes da administração de LPS a uma dose de 7,5 µg / aplicação (Barlow et al., 2012) (Figura 13).

3.4 MODELO MURINO DE SENSIBILIZAÇÃO A OVALBUMINA EXACERBADO PELO LPS

A instilação de LPS foi realizada vinte e quatro horas após o último desafio de antígeno no dia 29. A administração de LPS foi baseada no protocolo de Starkhammar et al. (2012), que demonstrou que a dose baixa utilizada foi capaz de induzir aumento no número de neutrófilos e hiperresponsividade brônquica. O tratamento foi realizado com 20 µl de PBS + 0,1 mg/ml de *Escherichia coli* 0127: B8 (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, EUA) (Figura 13).

Figura 13 - Protocolo de sensibilização com ovoalbumina, tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL17 e modelo murino de sensibilização a ovoalbumina exacerbado pelo LPS.

3.5 MEDIDA DO ÓXIDO NÍTRICO EXALADO (NO EXALADO)

Após 24 horas de instilação intratraqueal com LPS ou solução salina, os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (70 mg/kg), traqueostomizados e, em seguida, conectados a um ventilador para pequenos animais (Harvard Apparatus, South Natick, MA, EUA) a 60 respirações/min com um volume corrente de 10 mL / kg. Um balão Mylar foi utilizado na válvula expiratória do ventilador para coletar os níveis de NO exalado por dez minutos. Ao mesmo tempo, para evitar a contaminação ambiental, um filtro NO estava ligado à válvula inspiratória do ventilador. Por meio da quimioluminescência e utilizando um analisador (calibrado com gás de NO de boa resposta a 47 partículas por bilhão (ppb) (NOA 280; Sievers Instruments Inc, Boulder, CO, EUA), as concentrações de NO exalado foram analisadas (Prado et al., 2012).

3.6 AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Uma vez que o NO exalado foi coletado, a avaliação da hiperresponsividade à metacolina foi iniciada usando o software LABDAT (RHT-InfoData, Montreal, Quebec, Canadá). Para medir a pressão traqueal (Ptr), utilizou-se o transdutor de pressão diferencial 142PC05D (Honeywell, Freeport, IL), enquanto o fluxo (V') foi medido por um pneumotacografo (Fleisch-4,0, OEM Medical, Richmond, VA, EUA); ambos estavam conectados à cânula traqueal. Para uma definição precisa das alterações do volume pulmonar (V), um sistema eletrônico foi usado para integrar o circuito de fluxo. Utilizamos computadores para armazenar e coletar traços de Ptr, V' e V (Figura 14). Estes valores foram utilizados para calcular a resistência (Rrs) e elastância (Ers) basais e máximos do sistema respiratório após a administração de aerossol de metacolina (3, 30 e 300 mg/ml, por 1 minuto). A seguinte equação foi aplicada: $Ptr(t) = Ers \times V(t) + Rrs \times V'(t)$, onde t é o

tempo (Possa et al., 2012; Prado et al., 2006). Após a avaliação da mecânica do sistema respiratório, os animais foram eutanásicos pela exsanguinação da aorta abdominal. Posteriormente, os pulmões foram removidos para os estudos posteriores.

Figura 14 - Esquema demonstrando realização da mecânica do sistema respiratório: Os animais foram colocados em um pletismógrafo de acrílico e conectados a um ventilador mecânico (120 ciclos por minuto, 10 mL/Kg), um sistema de inalação conectado ao ventilador liberava doses de metacolina (3, 30, 300mg/mL, por 1 minuto cada). Os sinais de pressão traqueal e o volume pulmonar foram adquiridos através de transdutores diferenciais de pressão, convertidos por placa analógica digital. Através da equação do movimento onde: Fr – frequência respiratória, VC – volume corrente, (t) – tempo, Ptr – pressão traqueal, Rrs – resistência do sistema respiratório, Ers – elastância do sistema respiratório, V' – fluxo de ar e V – volume do pulmão, foram obtidos os valores de Ers e Rrs

3.7 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DAS VIAS AÉREAS

Para a padronização da análise imunohistoquímica, as secções foram desparafinadas e reidratadas e depois tratadas com Proteinase K a 37 °C

(20 minutos), seguidas de 20 min à temperatura ambiente e lavadas com NaCl tamponado com fosfato a 0,9% (PBS). O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado por incubação com 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 V (3 x 10 min) e as seções foram incubadas durante a noite com os anticorpos indicados (Figura 1). Após 24 horas, como lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com um anticorpo secundário usando ABCKit por Vectastain (Vector Elite-PK-6105 anti-cabra), PK-6101 (anti-coelho) e PK-6102 (anti-camundongo). Para uma vista de célula positiva, tais lâminas foram lavadas em PBS e como proteínas usando o cromossomo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, St, Louis, MO, EUA). As seções de tecido pulmonar foram contrastadas com uma Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e montadas usando um microscópio Entellan (Merck) (Possa et al., 2012).

Para uma avaliação morfométrica, obtivemos a densidade celular de células positivas para linfócitos CD4 +, CD8 +, células dendríticas, TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17, células T reguladoras FOXP3, CCL17TARC, iNOS, p-65-NFkB, TGF- β , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, ROCK 1 e ROCK2 nas paredes das vias aéreas. A técnica de contagem de pontos (Weibel, 2010) (Figura 15) foi utilizada com um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplados diretamente à ocular do microscópio. A análise foi realizada acoplando o retículo em 4 campos de parede da via aérea de 3-5 vias aéreas por animal. Os pontos coincidentes com células positivas foram divididos pelo número total de pontos da parede da via aérea. A área total do retículo é de $10^4 \mu m^2$. As análises foram realizadas com ampliação x1000, Os resultados são expressos como células positivas/ $10^4 \mu m^2$, e as medidas foram realizadas em condições cegas (Leick-Maldonado et al., 2004).

A análise da densidade óptica foi utilizada para determinar o conteúdo de fibras de colágeno e seus subtipos I e III, actina, decorina, lumican, biglicano e fibronectina, bem como de isoprostano PGF2 α . As imagens foram capturadas por um Sistema de Análise de Imagem composto por um microscópio Zeiss Axioplan, com uma câmera de vídeo acoplada, que envia

as imagens por um scanner de imagem para um computador. Através do software (Optimas v, 4,10), as imagens foram adquiridas e processadas. Para uma quantificação descrita acima, um polarizador foi acoplado ao microscópio. Cinco vias aéreas foram avaliadas em uma ampliação de 1000x para cada animal, e áreas positivas de fibras de colágeno e seus subtipos I, III e V, actina, decorina, lumican, biglican, fibronectina e isoprostano PGF2 α foram expressos como uma porcentagem da área total da parede da via aérea. As lâminas foram codificados e o pesquisador realizou a análise em condições cegas (Weibel, 1963).

Figura 15 - Fotomicrografia exemplificando o posicionamento do retículo na via aérea, para realização da técnica de contagem de pontos

3.8 EXTRAÇÃO DE RNA, TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-PCR)

No final da avaliação mecânica, um pulmão foi removido. O RNA pulmonar total foi extraído com TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), analisado para os índices de absorção de 260/280 e 260/230

nm e transcrito reverso para cDNA usando o kit cDNA SuperScript III (Invitrogen Life Technologies). A expressão de genes foi avaliada por RT em tempo real usando um gene de rotor (Qiagen, Roermond, Holanda) e SYBR Green como um corante fluorescente (Qiagen) com GAPDH como um gene de controle. As condições de reacção foram as seguintes: 95 °C durante 5 minutos, depois 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos e 60 °C durante 10 segundos. Os iniciadores usados e as temperaturas de recozimento são apresentados:

Arginase-1 (ARG-1), sentido
GCACTCATGGAAGTACACGAGGAC- (5'-3'),
CCAACCCAGTGATCTTGACTGA- (5'-3') antisentido; Transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), sentido: CCCTTTTGATGGCTGTG- (5'-3'); GGGCTAGGGTACTCATTAGA anti-sentido e sentido IL17: TGAAGGTCAACCTCAAAGTCT- (5'-3'); GAGGGATATCTAGGGTCTTCA antisentido - (5'-3') (60 °C; NM_10167164). Os dados foram obtidos como valores de Ct (Ct = número de ciclo em que as parcelas de PCR logarítmicas cruzam uma linha de limiar calculada) e utilizadas para determinar os valores de ΔCt . Os dados foram expressos como unidades arbitrárias usando a seguinte transformação [expressão = $1000 \times (2^{-\Delta Ct})$ unidades arbitrárias (AU)] (ΔCt = (Ct do gene alvo) (Pinheiro et al., 2015).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico foi realizado utilizando o programa SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Para os resultados que tiveram distribuição paramétrica, foi utilizado nas comparações múltiplas o teste de Holm-Sidak, sendo estes resultados expressos na forma de média e erro padrão e o gráfico na forma de barras. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS | 4

4 RESULTADOS

4.1 CURVA DOSE RESPOSTAS MÁXIMAS À METACOLINA

Os gráficos na Figura 16 mostram a percentagens de respostas máximas da Rrs (a) e Ers (b) após o desafio da metacolina nos seis grupos. Houve um aumento da %Rrs no grupo OVA comparado aos grupos controles ($p<0,05$). Houve uma redução da %Rrs e da %Ers no grupo OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p<0,05$). Houve um aumento da %Ers no grupo OVA-LPS comparado ao grupo OVA. No grupo OVA-LPS o tratamento com anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) atenuou a %Ers em comparação com os grupos OVA-LPS e OVA ($p<0,05$).

Figura 16 - Média $\pm$ SE de % aumento da Rrs (**a**) e Ers (**b**) após o desafio da metacolina para todos os grupos experimentais. * $p < 0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVA

4.2 ÓXIDO NÍTRICO EXALADO (NO EXALADO)

A Figura 17 mostra a concentração de NO exalado nos seis grupos. Nos grupo OVA houve um aumento no NO exalado em comparação com os grupos de controle SAL e SAL-antiIL17 ($p<0,05$). Houve uma redução no NO exalado nos grupos OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p<0,05$). No grupo OVA-LPS, o tratamento com anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) atenuou NO exalado em comparação com os grupos OVA-LPS ($p<0,05$).

Figura 17 - Média $\pm$ SE de óxido nítrico exalado para todos os grupos experimentais. * $p<0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p<0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p<0,05$ em comparação com o grupo OVA.

4.3 LINFÓCITOS CD4+, CD8+, CÉLULAS DENDRÍTICAS E CÉLULAS REGULADORAS T FOXP3

A Figura 18 mostra a expressão de células CD4+ e CD8+, dendríticas e T reguladoras FOXP3 nas paredes das vias aéreas. Nos animais do grupo OVA houve um aumento no número de células T CD4+, CD8+, dendríticas e T reguladoras FOXP3 em comparação com os grupos de controle SAL e SAL-antiIL17 ($p<0,05$). Houve uma redução nos grupos OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p<0,05$). No OVA-LPS, o tratamento com antiIL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) atenuou a expressão de células CD8+ e T reguladoras FOXP3 em comparação com os grupos OVA-LPS e OVA ($p<0,05$).

Figura 18a

Figura 18b

Figura 18c

Figura 18d

Figura 18 - Média $\pm$ SE de células CD4 + e CD8 +, células dendríticas e células T reguladoras FOXP3 para todos os grupos experimentais. * $p < 0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVA.

4.4 EXPRESSÃO GÊNICA DE VACHT/ mRNA

A Figura 19 mostra os níveis de mRNA de VACHT nos seis grupos. O grupo OVA mostrou aumento da expressão do gene VACHT em comparação com os grupos de controle SAL e anti-IL17 ($p < 0,05$). Houve uma redução nos grupos OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Além disso, no grupo OVA-LPS, o tratamento com anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) atenuou a expressão de mRNA de VACHT em comparação com os grupos OVA-LPS e OVA ($p < 0,05$).

Figura 19 - Média $\pm$ SE de Expressão de VACHT/ mRNA para todos os grupos experimentais. * $p < 0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS.

4.5 EXPRESSÃO CELULAR DE p65-NFkB

A Figura 20 mostra o número de células positivas para p65-NFkB nas paredes das vias aéreas. No grupo OVA observamos um aumento no número de células positivas para NFkB em comparação com os grupos de controle SAL e antiIL17 ($p<0,05$). Houve uma redução nos grupos OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p<0,05$). No grupo OVA-LPS, o tratamento com anti IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) atenuou o número de células positivas para p65-NFkB em comparação com os grupos OVA-LPS e OVA ($p<0,05$).

Figura 20 - Média $\pm$ SE de células positivas p65-NFkB para todos os grupos experimentais. * $p<0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p<0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p<0,05$ em comparação com o grupo OVA.

4.6 EXPRESSÃO CELULAR DE ROCK1 E ROCK2

A Figura 21 mostra o número de células positivas para ROCK 1 e ROCK 2 nas paredes das vias aéreas. Nos animais do grupo OVA houve um aumento no número de células positivas para ROCK 1 e ROCK 2 em comparação com os grupos controles SAL e SAL-antiIL17 ($p < 0,05$). Houve uma redução nos grupos OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). No grupo OVA-LPS, o tratamento com antiIL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) reduziu o número de células ROCK 1 e ROCK 2 positivas em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($P < 0,05$).

Figura 21 - Média $\pm$ SE de ROCK1 (a) e ROCK2 (b) para todos os grupos experimentais, * $p < 0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVA

4.7 RT-PCR E ANÁLISE MORFOMÉTRICA PARA IL-17

A Figura 22 mostra a comparação da expressão dos níveis de mRNA de IL-17 e a expressão celular desta citocina avaliada por análise morfológica após coloração imuno-histoquímica nos seis grupos. Nos grupos OVA e OVA-LPS, observamos um aumento na expressão do gene e número de células positivas para IL-17 em comparação com os grupos controles SAL e SAL- antiIL17 ($p < 0,05$). Houve uma redução na expressão gênica e no número de células positivas para IL-17 no grupo OVA-LPS-antiIL17 em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$).

Figura 22 - Média $\pm$ SE da RT-PCR (**a**) e análise morfométrica (**b**) para IL17 em todos os grupos experimentais, * $p < 0,05$, em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OVA

4.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NAS VIAS AÉREAS

A Tabela 1 mostra o número de células positivas TNF- α , CCL17 / TARC, CCL11 / eotaxina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17 nas paredes das vias aéreas. Nos animais dos grupos OVA e OVA-LPS, houve um aumento no número de células positivas para TNF- α , CCL17 / TARC, CCL11 / eotaxina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 em comparação com os grupos controles SAL e SAL-antiIL17 ($p < 0,05$). Houve um efeito do tratamento com anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) no número de células positivas para CCL17 / TARC, CCL11 / eotaxina, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13 em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Média $\pm$ SE da análise morfométrica de marcadores inflamatórios nas vias aéreas, * $p < 0,05$, comparado com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, comparado com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p < 0,05$, comparado com o grupo OVA

Marcadores Inflamatórios	SAL	OVA	SAL-antiIL17	OVA-antiIL17	OVA-LPS	OVA-LPS-antiIL17
TNF- α (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$)	2,05 $\pm$ 0,33	5,75 $\pm$ 0,73*	0,92 $\pm$ 0,42	6,65 $\pm$ 0,71 *	6,26 $\pm$ 1,36*	3,79 $\pm$ 0,80*
CCL17/TARC (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,06 $\pm$ 0,20	5,19 $\pm$ 0,24*	0,83 $\pm$ 0,16	2,31 $\pm$ 0,28**	9,26 $\pm$ 0,37* #	4,73 $\pm$ 0,35**
CCL11/Eotaxina (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,60 $\pm$ 0,12	3,89 $\pm$ 0,42*	0,47 $\pm$ 0,16	0,27 $\pm$ 0,07**	1,29 $\pm$ 0,33** #	0,48 $\pm$ 0,08** #
IL-2 (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,17 $\pm$ 0,18	5,00 $\pm$ 0,27*	1,38 $\pm$ 0,17	3,02 $\pm$ 0,27**	7,64 $\pm$ 0,35* #	1,95 $\pm$ 0,10** #
IL-4 (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,50 $\pm$ 0,13	4,37 $\pm$ 0,25*	0,40 $\pm$ 0,04	2,30 $\pm$ 0,37**	7,80 $\pm$ 0,42*	4,85 $\pm$ 0,70* ** #
IL-5 (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,03 $\pm$ 0,12	4,41 $\pm$ 0,32*	1,19 $\pm$ 0,18	1,74 $\pm$ 0,14**	6,84 $\pm$ 0,81* #	3,35 $\pm$ 0,29**
IL-6 (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,63 $\pm$ 0,11	5,79 $\pm$ 0,34*	0,88 $\pm$ 0,13	1,52 $\pm$ 0,14**	7,81 $\pm$ 0,34* #	2,23 $\pm$ 0,28*** #
IL-10 (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	0,67 $\pm$ 0,14	5,50 $\pm$ 0,44*	0,37 $\pm$ 0,12	1,52 $\pm$ 0,14**	9,30 $\pm$ 0,51* #	2,93 $\pm$ 0,30*** #
IL-13 (células / $10^4 \mu\text{m}^2$)	1,29 $\pm$ 0,21	4,94 $\pm$ 0,55*	0,71 $\pm$ 0,10	2,26 $\pm$ 0,37**	9,00 $\pm$ 0,55* #	4,66 $\pm$ 1,00***

4.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA PARA MARCADORES DE REMODELAMENTO NAS VIAS AÉREAS

A Tabela 3 mostra a fração de volume das fibras colágenas tipos I e III, decorina, fibronectina, biglican, lumican, actina, e do número de células positivas para TGF- β , MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 nas paredes das vias aéreas. Nos animais dos grupos OVA e OVA-LPS houve um aumento na fração de volume de fibras de colágeno tipo I e III, decorina, fibronectina, biglican, lumican, actina, e do número de células positivas para TGF- β , MMP-9, MMP-12 e TIMP-1 em comparação com os grupos SAL e SAL-antiIL17 ($p < 0,05$). Houve um efeito do tratamento com anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) em todos esses marcadores em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($p < 0,05$). Para a expressão de fibras de colágeno tipo I e III, o efeito de anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) foi observado somente quando comparado ao grupo OVA-LPS ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Média $\pm$ SE da análise morfométrica para marcadores de remodelamento nas vias aéreas, *p<0,05, comparado com os grupos SAL e SAL-antiIL17; **p<0,05, comparado com os grupos OVA e OVA-LPS; #p<0,05, comparado com o grupo OVA

Marcadores de Remodelamento	SAL	OVA	SAL-antiIL17	OVA-antiIL17	OVA-LPS	OVA-LPS-antiIL17
Fibras Colágenas Typo I (%)	13,41 $\pm$ 1,24	24,12 $\pm$ 1,51*	12,63 $\pm$ 0,88	19,04 $\pm$ 2,06***	26,97 $\pm$ 1,80*	22,97 $\pm$ 0,65*
Fibras Colágenas Typo III (%)	0,87 $\pm$ 0,30	10,02 $\pm$ 1,51*	1,04 $\pm$ 0,35	1,13 $\pm$ 0,20**	15,01 $\pm$ 1,47*#	10,25 $\pm$ 1,14*
Decorina (%)	1,79 $\pm$ 0,83	9,45 $\pm$ 2,23*	1,64 $\pm$ 0,47	5,61 $\pm$ 0,90***	16,90 $\pm$ 0,84*#	4,23 $\pm$ 0,76***#
Biglican (%)	6,96 $\pm$ 0,54	20,03 $\pm$ 1,64*	7,52 $\pm$ 0,40	10,00 $\pm$ 0,84***	19,00 $\pm$ 1,22*	9,43 $\pm$ 0,67***#
Lumican (%)	15,01 $\pm$ 1,30	26,37 $\pm$ 0,69*	16,23 $\pm$ 0,45	14,78 $\pm$ 0,01**	24,24 $\pm$ 1,09*	15,94 $\pm$ 1,18**#
Fibronectina (%)	1,32 $\pm$ 0,13	14,54 $\pm$ 0,30*	1,30 $\pm$ 0,09	11,42 $\pm$ 0,79***	42,62 $\pm$ 1,69*#	11,22 $\pm$ 0,58***#
Actina (%)	15,20 $\pm$ 1,12	27,89 $\pm$ 1,97*	16,26 $\pm$ 1,96	16,17 $\pm$ 1,91	25,40 $\pm$ 3,06*	27,63 $\pm$ 1,50*
TGF- β (células/10 ⁴ μ m ²)	1,00 $\pm$ 0,35	22,04 $\pm$ 1,88*	1,24 $\pm$ 0,38	11,20 $\pm$ 1,01***	41,77 $\pm$ 1,90*#	11,27 $\pm$ 1,29***#
MMP-9 (células /10 ⁴ μ m ²)	1,19 $\pm$ 0,28	16,87 $\pm$ 0,40*	1,73 $\pm$ 0,19	5,82 $\pm$ 0,54***	23,70 $\pm$ 2,40*#	10,81 $\pm$ 1,07***#
MMP-12 (células /10 ⁴ μ m ²)	0,40 $\pm$ 0,08	13,31 $\pm$ 0,80*	0,39 $\pm$ 0,15	2,65 $\pm$ 0,45***	13,43 $\pm$ 0,77*	3,06 $\pm$ 0,51***#
TIMP-1 (células /10 ⁴ μ m ²)	0,54 $\pm$ 0,25	5,00 $\pm$ 0,42*	0,62 $\pm$ 0,12	1,68 $\pm$ 0,26***	8,99 $\pm$ 1,40*#	3,79 $\pm$ 0,65***

4.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA E PARA MARCADORES DA VIA NO-ARGINASE E ESTRESSE OXIDATIVO NAS VIAS AÉREAS

A Figura 23 mostra número de células positivas para iNOS (a), a fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas paredes das vias aéreas (b) e expressão gênica de mRNA para arginase 1 (c). No grupo OVA houve um aumento no número de células positivas para iNOS, fração de volume de 8-iso-PGF2 α e mRNA para arginase 1 em comparação com os grupos controles SAL e SAL-antiIL17 ($p<0,05$). Houve uma redução nos grupos OVA-antiIL17 quando comparados ao grupo OVA e OVA-LPS ($p<0,05$). No grupo OVA-LPS, o tratamento com anti-IL17 (grupo OVA-LPS-antiIL17) reduziu o número de células positivas para iNOS, fração de volume de 8-iso-PGF2 α nas paredes das vias aéreas e níveis de mRNA para arginase 1 no grupo OVA-LPS-antiIL17 em comparação com os grupos OVA e OVA-LPS ($P<0,05$).

Figura 23 a

Figura 23 b

Figura 23 c

* $p < 0,05$, comparado com os grupos SAL e SAL-antiIL17; ** $p < 0,05$, comparado com os grupos OVA e OVA-LPS; # $p < 0,05$, comparado com o grupo OVA.

Figura 23 - Média $\pm$ SE da análise morfométrica para a via No-arginase e estresse oxidativo nas vias aéreas.

4.11 ANÁLISE QUALITATIVA

As fotomicrografias mostram a presença de inflamação (células positivas para IL-17 e IL-5), remodelamento (células positivas para TGF- β e fibras colágenas tipo I), e resposta de estresse oxidativo (células positivas para iNOS e fração de volume 8-iso-PGF2 α) nas paredes das vias aéreas (Figura 24) dos animais dos grupos grupo OVA e OVA-LPS em relação aos controles SAL e SAL-antiIL17. O tratamento com anti-IL17 nos grupos OVA-antiIL17 e OVA-LPS-antiIL17 reduziu as mudanças anteriormente citadas nas paredes das vias aéreas, o que pode ser observado nas fotomicrografias representativas.

Figura 24 A

Figura 24 B

Figura 24 C

Figura 24 - Marcadores inflamatórios (A), de remodelamento (B) e de estresse oxidativo (C) nas paredes das vias aéreas; fotomicrografia dos resultados das análises imuno-histoquímicas do processo inflamatório, de remodelamento e de estresse oxidativo nas paredes das vias aéreas utilizadas para detectar IL-17, IL-5, TGF- β , colágeno I, iNOS e PGF2 α . Ampliação de 1000X. Todos os seguintes grupos experimentais estão representados: SAL, OVA, SAL-antiIL17, OVA-antiIL17, OVA-LPS e OVA-LPS-antiIL17. Observamos que o tratamento anti-il17 reduziu a mudança acima nas paredes das vias aéreas, o que pode ser observado nas fotomicrografias representativas

DISCUSSÃO | 5

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com anti-IL17A nas vias aéreas de um modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS.

No modelo de asma experimental utilizado avaliamos a hiperreatividade das vias aéreas. Observamos que animais com asma exacerbada pelo LPS mostraram uma melhor resposta correspondente a alterações nas vias aéreas distais (resposta máxima de elastância). Esses dados sugerem que esse efeito de constrição é devido aos efeitos do LPS na via aérea distal, provavelmente secundário a produção de NO e isoprostanos. Este efeito foi significativamente modificado pelo tratamento anti-IL17. Corroborando essa hipótese, alguns autores mostraram que a redução do NO exalado, a expressão de iNOS, arginase e principalmente Rho-quinase 1 contribuem para o controle da resposta contrátil. Além disso, houve correlação entre as respostas respiratórias contráteis e a expressão de iNOS, arginase e isoprostano (Possas et al., 2012, Aristóteles et al., 2013; Righetti et al., 2014; Pigati et al., 2015).

Notavelmente, observamos o controle da elastância máxima, mas não a resistência do sistema respiratório nos animais com asma exacerbada pelo LPS. Estudos subsequentes devem avaliar se a administração de doses repetidas de anti-IL17 após a instilação de LPS também pode contribuir para o controle da resposta contrátil proximal da via aérea.

Em relação ao tratamento com anti-IL17, alguns autores já demonstraram sua importância na modulação de várias alterações funcionais pulmonares, bem como músculo liso na asma. Kudo et al. (2012) relataram em um estudo de rato *in vitro* que a IL-17 pode afetar diretamente o músculo liso na via aérea por atenuação da resposta contrátil e, portanto, a resposta de hiperresponsividade brônquica. Manni et al. (2016)

demonstraram que IL17A também contribui de forma independente para a hiperreatividade das vias aéreas em um modelo experimental de asma mista resistente a esteroides. Os autores acreditam que essas respostas estão relacionadas ao aumento da expressão de células Th2 / Th17. No entanto, não há estudos que avaliem as alterações funcionais na associação dos dois modelos, bem como os efeitos do tratamento com IL-17 sobre essas mudanças.

No que diz respeito aos mecanismos efetores e de sinalização intracelular mediados pela expressão de Rho quinase 1 e 2 e pelo fator de transcrição NFkb, observamos que, no modelo de asma experimental, houve aumento no número de células positivas para Rho quinase 1 e 2 e NFkb, e o tratamento com anti-IL17 atenuou essas respostas. No entanto, no modelo de inflamação alérgica crônica por LPS houve potencialização dessa resposta e aumento no número de células positivas para Rho quinase 1 e NFkb. Evidências demonstram que a ativação do NFkb resulta em piora da inflamação nas vias aéreas asmáticas (Tan et al., 2016). Estudos experimentais demonstraram o aumento da expressão de NF-KB nos pulmões após a exposição e o desafio dos alérgenos (Ather et al., 2011; Aristóteles et al., 2013).

Vários estudos em modelos experimentais de asma indicam a importância da Rho-quinase na patogênese da asma (Possa et al., 2012, Righetti et al., 2014). Alguns estudos demonstraram o envolvimento da Rho-quinase na modulação da hiperatividade das vias aéreas (Righetti et al., 2014), resposta inflamatória em torno das vias aéreas (Taki et al., 2007) e contração do músculo liso das vias aéreas em humanos (Kudo et al., 2012). Estes efeitos sugerem que a inibição da sinalização da Rho-quinase pode representar uma nova estratégia para resolver as limitações do fluxo aéreo na asma (Donnelly et al., 1995). Recentemente, estudos de modelos animais de inflamação alérgica crônica mostraram que o tratamento com o inibidor de Rho-quinase Y-27632 (que inibe as isoformas 1 e 2) atenua a hiperresponsividade, resposta inflamatória, estresse oxidativo e

remodelamento da matriz extracelular das vias aéreas e dos septos alveolares (Possa et al., 2012; Righetti et al., 2014).

No presente estudo, sugerimos que os efeitos observados no controle da hiperreatividade brônquica associada ao uso de anti-IL17 também podem depender do controle da expressão de Rho quinase.

Com relação à resposta inflamatória, neste modelo experimental de inflamação alérgica crônica observamos um aumento de CD4+, CD8+, células dendríticas, células T reguladoras FOXP3, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, TNF- α , CCL17/TARC e CCL11 / eotaxina. A maioria dessas alterações foi descrita anteriormente em modelos de inflamação alérgica crônica (Cohn et al., 2004; Galli et al., 2008; Taher et al., 2010; Cosmi et al., 2011). Analisando o modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS, observamos que a maioria dessas alterações foi potencializada, exceto CD8+ e CCL11/ eotaxina.

Observamos que o tratamento anti-IL17 atenuou as alterações de todos os parâmetros estudados, observadas nos grupos OVA-antiIL17 e OVA-LPS-antiIL17. Alguns estudos também corroboraram nossas descobertas. Nesse sentido, estudos anteriores de modelos experimentais e humanos mostraram que as células CD4+ e CD8+ se tornam ativadas pelo desenvolvimento de perfis de citocinas Th1, Th2 e Th17 durante uma resposta imune (Cohn et al., 2004; Galli et al., 2008; Cosmi et al., 2011; Taher et al., 2010; Schaller et al., 2005).

Schaller et al. (2005) estudaram o papel de um inibidor de células CD8+ em camundongos sensibilizados e demonstraram uma diminuição significativa na hiperresponsabilidade e nas citocinas IL-2, IL-5 e IL-13. Esses dados indicam que as células CD8+ desempenham um papel importante na exacerbação das respostas alérgicas através da produção de citocinas IL-4 e IL-13. Em outro estudo com um modelo experimental de asma, demonstrou que as células CD4+/Th2 induziram inflamação, e durante a fase crônica, houve produção de IL-17.

Utilizando um modelo de inflamação alérgica, Choy et al. (2015) demonstraram que as citocinas Th2 suprimiram as respostas Th17. Os autores relataram que a neutralização de IL-4 e/ou IL-13 reduziu as células Th17 aumentadas e inflamação neutrofílica no pulmão. No entanto, a neutralização de IL-13 e IL-17 protegeu os animais de eosinofilia, hiperplasia mucosa e hiperreatividade das vias aéreas, bem como aboliu a inflamação neutrofílica, sugerindo que as terapias combinadas que controlam as respostas Th2 e Th17 podem maximizar a eficácia terapêutica em asmáticos como observado em nossos resultados.

Confirmando evidências da literatura, que as células do perfil Th2 modulam a inflamação eosinofílica da asma (Woodruff et al., 2009; Carr et al., 2016) e que os tratamentos que reduzem essas citocinas podem inibir essa resposta (Choy et al., 2011; Varricchi et al., 2016; Nixon et al., 2017; Zhang et al., 2017), observamos que o tratamento com anti-IL17A atenuou a resposta a IL-4, IL-5 e citocinas IL-13 em animais sensibilizados (OVA + antiIL17, OVA + LPS + antiIL17). Estes resultados são consistentes com estudos anteriores sugerindo que o tratamento anti-IL17A inibe a inflamação eosinofílica mediada por Th2 (Song et al., 2008; Wakashin et al., 2008; Lajoie et al., 2010; Willis et al., 2015).

Assumindo um papel importante no controle da resposta imune, as células T reguladoras naturais e adaptativas, expressam CD25 e o fator nuclear FOXP3 (Zhang et al., 2016). À medida que as células Tregs são consideradas adaptativas, estas exercem seus papéis através de citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e sua deficiência está correlacionada com a gravidade da asma (Shi et al., 2011). O TGF- β parece modular a expressão de FOXP3 por Tregs, enquanto que a IL-10 inibe a ativação de células apresentadoras de antígenos ao controlar a inflamação (Shi et al., 2011; Zhang et al., 2016).

Os pacientes com asma têm aumento no número de células T reguladoras FOXP3 e aumento da produção de IL-17A, que são marcadores alternativos de células Treg e Th17, respectivamente (Zhang et al., 2016).

Em nosso estudo, observamos um aumento no número de células T reguladoras FOXP3 em animais exacerbados e o tratamento com anti-IL17 controlou essa resposta. Esses dados sugerem que as células T reguladoras FOXP3 podem ser ativadas para suprimir as respostas imunes Th17.

Observamos que a IL-10 e TGF- β em animais com exposição crônica de OVA foi aumentada quando houve a exacerbação pelo LPS e o tratamento com anti-IL17 controlou essa resposta. O TGF- β , que é uma citocina com propriedades imunomoduladoras, induz a secreção de IL-10 a partir de macrófagos ou células T reguladoras (Lambrecht; Hammad, 2015; Rigas et al., 2017). Nossa hipótese é que o aumento das células positivas para IL-10 em nosso modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS foi modulado pelo aumento do TGF- β .

O aumento das células IL-17 mostrou-se correlacionado com o recrutamento neutrofílico em um modelo de asma (Choy et al., 2015). Usando um modelo murino de asma, Park et al. (2010) demonstraram que a neutralização da IL-17A reduziu significativamente a infiltração de neutrófilos. De acordo com nossos resultados, esses dados sugerem que a resposta Th17 pode contribuir para a patogênese da asma e que sua modulação pode ser uma estratégia farmacológica para o controle da asma.

O sistema antiinflamatório colinérgico foi descrito há anos (Borovikova et al., 2000; Prado et al., 2002; Straub et al., 2006; Gallowitsch-Puerta; Pavlov, 2007; Prado et al., 2013). Há evidências que respostas Th17 podem estar envolvidas nos efeitos do sistema antiinflamatório colinérgico com atenuação da neuroinflamação (Nizri et al., 2009). Sendo assim, nossa hipótese foi que anti-IL17 poderia interferir com o sistema antiinflamatório colinérgico. A este respeito, a função VACht e a conseqüente liberação endógena de ACh estão envolvidas no sistema antiinflamatório colinérgico e o nível de liberação de ACh depende dos níveis de VACht (Prado et al., 2013). Recentemente, foi demonstrado que o VACht é necessário para manter a homeostase pulmonar em camundongos (Pinheiro et al., 2015). Frente a essa evidência, optamos por quantificar os níveis de VACht por

RT-PCR e mostramos que no modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado ou não pelo LPS, houve um aumento na expressão gênica VACHT/mRNA. O tratamento anti-IL17 atenuou os níveis de VACHT, sugerindo que os níveis de VACHT estão associados à gravidade da inflamação pulmonar.

Observamos também que no modelo experimental de asma, há uma resposta de remodelamento da matriz extracelular, caracterizada por um aumento de todos os parâmetros avaliados. Quando o modelo de inflamação alérgica crônica foi exacerbado com LPS, observamos potencialização da resposta ao número de células positivas para MMP9, TIMP1, conteúdo de fibras colágenas tipo III, TGF beta, decorina e de fibronectina. O tratamento com anti-IL17 no modelo de asma controlou todas as mudanças descritas.

A literatura mostra que modelos experimentais de inflamação alérgica crônica em camundongos e cobaias apresentam aumento do conteúdo de colágeno, hipertrofia e hiperplasia das vias aéreas e aumento da produção de muco (Bousquet et al., 1990; Lloyd et al., 2000).

Neste modelo, para avaliar se anti-IL17 pode neutralizar o remodelamento das vias aéreas, quantificamos a deposição de fibras de colágeno I e III em torno das vias aéreas. Observamos que anti-IL17 atenuou a deposição de fibras de colágeno I e III na matriz extracelular nas vias aéreas de animais sensibilizados à ovalbumina. Além disso, houve potencialização na redução das fibras de colágeno tipo III no grupo OVA-LPS-anti-IL17. As fibras de colágeno tipo III são produzidas por células musculares lisas e células reticulares, causando espessamento da membrana basilar reticular e, portanto, uma importante correlação com a hiperreatividade. Por outro lado, as fibras de colágeno tipo I são produzidas por fibroblastos e têm maior capacidade de suportar tensões (Burgess et al., 2016). Esses achados sugerem que anti-IL17 pode atenuar não apenas a inflamação, mas também o remodelamento presente neste modelo de inflamação alérgica crônica. O presente estudo corrobora um estudo anterior que encontrou um aumento na densidade de fibras de colágeno nas vias

aéreas de camundongos sensibilizados com ovalbumina (Toledo et al., 2013).

Com a produção estimulada pela citocina TGF- β , o colágeno é um marcador potencial do remodelamento da asma (Grover et al., 1995). Na asma grave, há aumento na deposição de colágeno I e III e massa muscular lisa em biópsias brônquicas (Chakir et al., 2003).

Decorina, biglicano e lumican representam proteoglicanos que desempenham um papel importante na interação de fibrilas de colágeno entre si e com outros componentes da matriz extracelular (Kalamajski; Oldberg, 2010). Biglicano e decorina são proteoglicanos envolvidos na estabilização da fibrogênese do colágeno no tecido (Chiba et al., 2007). A este respeito, o aumento da expressão de decorina em pacientes com asma pode ser um mecanismo protetor para modular o remodelamento pulmonar (Pouladi et al., 2004). No entanto, uma quantidade crescente de decorina poderia desestabilizar o espaçamento das fibras de colágeno e criar uma matriz mais rígida, o que pode afetar a elasticidade geral do tecido pulmonar (Gubbiotti et al., 2016). Decorina também está envolvida na regulação da função TGF- β (Weitof et al., 2014). O TGF- β promove a diferenciação das células T reguladoras (Treg), que estão relacionadas ao processo de cicatrização e à resolução da inflamação (Araujo et al., 2008; Sanjabi et al., 2017). Em nosso estudo, após o tratamento com anti-IL17 houve uma redução na expressão de TGF- β . A fibronectina também possui uma função essencial na regulação morfológica durante o desenvolvimento pulmonar. Na asma, os níveis de fibronectina, juntamente com o colágeno I e III, são aumentados no músculo liso da parede da via aérea (Hassan et al., 2015).

Demonstramos, portanto que houve aumento da deposição de decorina, biglican, lumican e fibronectina em um modelo experimental de asma. Resaltamos que o tratamento anti-IL17 atenuou essas respostas em ambos os grupos OVA-anti-IL17 e OVA-LPS-anti-IL17.

No presente estudo, também encontramos maior expressão de MMP-9 e TIMP-1 em animais sensibilizados e estas alterações foram revertidas

após o tratamento anti-IL17, A MMP-9 é um marcador de inflamação e remodelamento das vias aéreas em pacientes com asma grave (Lemjabbar et al., 1999; Naik et al., 2016) sendo encontrada em altas concentrações no plasma e no fluido do lavado broncoalveolar juntamente com uma diminuição da resposta de TIMP-1 em pacientes com exacerbação aguda de asma e asmáticos graves (Belleguic et al., 2002). Nossos resultados mostraram um aumento no número de células MMP-9 positivas no modelo de inflamação alérgica crônica e também nos animais exarcebados pelo LPS. Além disso, nossos dados revelaram um aumento no TIMP1 nos mesmos grupos.

Os modelos murinos de inflamação alérgica demonstraram que MMP12 mRNA e atividade da proteína MMP12 estavam aumentados nas vias aéreas (Pouladi et al., 2004; Warner et al., 2004; Chiba et al., 2007) relataram que ratos com deficiência de MMP12 apresentaram redução significativa da infiltração de células inflamatórias nas vias aéreas e regiões peribronquiolares e reduções em TNF- α , IL-5 e CCL17 / TARC.

Demonstramos pela primeira vez que o tratamento anti-IL17 contribuiu para o controle de MMP12, MMP9, TIMP1, fibras colágenas, decorina, biglicano, lumican, fibronectina e TGF beta em um modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS.

No presente estudo, observamos que, no modelo de inflamação alérgica crônica, todos os parâmetros avaliados para as vias NO-arginase e o estresse oxidativo foram aumentadas e atenuadas pelo tratamento com anti-IL17. Além disso, no grupo OVA-LPS houve potencialização da resposta de todos os parâmetros avaliados, a saber, o número de células positivas para iNOS, o conteúdo de isoprostano PGF2 α , NO exalado e a quantificação do conteúdo do mRNA para arginase I.

Vários autores sugeriram a importância das respostas ao estresse oxidativo e das vias NO-arginase na fisiopatologia da asma, mostrando correlação entre essas respostas e a gravidade dos sintomas de asma associados à limitação do fluxo aéreo, hiperreatividade e remodelamento

das vias aéreas (Prado et al., 2006; Angeli et al., 2008; Brussino et al., 2010; Voynow et al., 2011).

Recentemente, os níveis de óxido nítrico exalado e óxido nítrico sintase (iNOS) foram associados aos níveis de IL-17A (Chien et al., 2013; Al-Harbi et al., 2015), estudaram o papel da IL-17A em um modelo murino de asma alérgica e observou que a produção de oxidantes nas vias aéreas pode regular a produção de células T IL-17A e CD4 + na circulação sistêmica. Outros estudos também mostraram que as respostas de estresse oxidativo nas vias aéreas aumentam as respostas Th17 nas vias aéreas (Nadeem et al., 2003; Maarsingh et al., 2006).

Vários relatos na literatura sugerem um aumento na atividade da arginase nos modelos agudos e crônicos de asma alérgica de cobaias (Meurs et al., 2000; Maarsingh et al., 2009b; Aristóteles et al., 2012). No entanto, até a presente data, nenhum estudo havia investigado o impacto do tratamento anti-IL17 no estresse oxidativo em um modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS.

CONCLUSÕES | 6

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

1. Neste modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica notou-se hiperresponsividade brônquica, presença de resposta inflamatória Th1/Th2/Th17, aumento de quimiocinas, do remodelamento da matriz extracelular, da via NO-arginase, de estresse oxidativo, na expressão gênica VACHT/ mRNA e fator de transcrição NFkb. O tratamento com anti IL17 atenuou todas as respostas.
2. No modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS houve potencialização da maior parte das alterações observadas no grupo apenas sensibilizado (resposta máxima de elastância do sistema respiratório, células CD4 positivas, do número de células positivas para IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, TNF alfa, TARC, iNOS, isoprostano PGF2 alfa, NO exalado, MMP9, TIMP1, TGF beta, conteúdo de fibras colágenas tipo III, decorina, fibronectina, além do aumento do número de células positivas para Rho-quinase 1 e 2, NFkb e expressão genica mRNA para VACHT.
3. O tratamento com anti-IL17 no modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS reduziu resposta máxima de elastância do sistema, NO exalado, células CD4+ e CD8+ positivas, células dendríticas, FOXP3, mRNA para VACHT, NFkb, Rho quinase 1, mRNA para IL-17, número de células positivas para TNF alfa, eotaxina, IL2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, iNOS, TGF beta, MMP9, MMP12, TIMP1, isoprostano PGF2 alfa, NO exalado, conteúdo de decorina, biglicano, lumican, fibronectina, actina, e mRNA para arginase 1. O tratamento com anti-IL17 no modelo de inflamação alérgica crônica exacerbado pelo LPS não reduziu o número de células positivas para IL-4, IL-13,

TARC, rho quinase 2 e o conteúdo de fibras colágenas tipo I e III em relação aos animais não exacerbados. Consideramos doses repetidas de anti-IL17 possam contribuir para um controle mais efetivo dessas alterações.

4. Embora outros mecanismos possam estar envolvidos e doses repetidas de anti-IL17 nos animais com inflamação alérgica crônica exacerbada pelo LPS também necessitem ser testadas, o tratamento com anti-IL17 se mostrou uma ferramenta farmacológica importante para o tratamento das principais alterações, como hiperresponsividade, remodelamento e estresse oxidativo.
5. Finalmente, o controle com anti-IL17 da hiperreatividade, remodelamento e estresse oxidativo neste modelo de asma exacerbado pelo LPS pode estar relacionado também à modulação da expressão do fator de transcrição NFkb, Rho quinase 1 e VACHT / mRNA. Dentre os mecanismos envolvidos no controle pelo tratamento com anti-IL17 das alterações estudadas no modelo de asma experimental observamos a importância da expressão do fator de transcrição NFkb e de Rho quinase 1.

REFERÊNCIAS | 7

7 REFERÊNCIAS

Abelius MS, Ernerudh J, Berg G, Matthiesen L, Nilsson LJ, Jenmalm MC. High cord blood levels of the T-helper 2-associated chemokines CCL17 and CCL22 precede allergy development during the first 6 years of life. *Pediatr Res* 2011;70(5):495-500.

Abdelmageed ME, El-Awady MS, Abdelrahim M, Suddek GM. LPS-RS attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves NF-kappaB inhibition. *Can J Physiol Pharmacol* 2016;20:1-7.

Alfonso A, Grundahl K, McManus JR, Asbury JM, and Rand JB. Alternative splicing leads to two cholinergic proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 1994;241:627-630.

Akuthota P, Wang H and Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10(1):14-19.

Agache I, Ciobanu C, Agache C, Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respiratory Medicine* 2010;104:1131-1137.

Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PR, Tibério IF. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(6):1197-205.

Al-Harbi Naif O, Ahmed Nadeem, Mohammed M. Al-Harbi et al. Oxidative airway inflammation leads to systemic and vascular oxidative stress in a murine model of allergic asthma. *International Immunopharmacology* 2015;26:237-245.

Al-Muhsen, S, Letuve S, Vazquez-Tello A, Pureza MA, Al-Jahdali. H, Bahammam. AS, Hamid Q, Halwani R. Th17 cytokines induce profibrotic cytokines release from human eosinophils. *Respir Res* 2013; (14):34-74.

Ammit, AJ. The role of mRNA stability in airway remodelling. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2005;18(6):405-415.

Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, Mauad T, Saldiva PH, Martins MA. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicol Pathol* 2008;36(5):680-6.

Araujo BB, Dolhnikoff M, Silva LF, Elliot J, Lindeman JH, Ferreira DS, Mulder A, Gomes HA, Fernezlian SM, James A, Mauad T. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. *Eur Respir J* 2008;32(1):61-9.

Aristóteles LRCRB, Righetti, RF; Pinheiro N M, Franco RB, Starling CM, Silva JCP,1 Pigati PA, Caperuto LC, Prado CM, Dolhnikoff M, Martins MA, Leick EA, and Tibério IFLC. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. *BMC Pulmonary Medicine* 2013;13:52.

Arvidsson U, Riedl M, Elde R, and Meister B. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic

neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 1997;378:454-467.

Ather JL, Hodgkins SR, Janssen-Heininger YMW, and. Poynter ME. Airway Epithelial NF-kB Activation Promotes Allergic Sensitization to an Innocuous Inhaled Antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:631-638.

Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem* 2012;60:262-268.

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

Barlow JL, Flynn RJ, Ballantyne SJ, McKenzie AN. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. *Clin Exp Allergy* 2011;41(10):1447-55.

Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:636-645.

Belleguic C, Corbel M, Germain N, Lena H, Boichot E, Delaval P H and. Lagente V. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(2):217-223.

Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:(10)1360-1368.

Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, et al. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 2006;354:697-708.

Belvisi, MG. Regulation of Inflammatory Cell Function by Corticosteroids. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2004; 1(3):207-214.

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.

Bittar HET, Yousem SA and Wenzel SE. Pathobiology of Severe Asthma. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2015;10:511-45.

Boulet LP. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2018;24(1):56–62.

Bousquet J, Chané P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel FB The Eosinophilic Inflammation in Asthma. *N Engl J Med* 1990;323:1033-1039.

Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Ait-Khaled N, Baena-Cagnani C E, Bleecker ER et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;126:926-938.

Borovikova, LV, Ivanova SZhang, M, Yang H, Botchkina GI, Watkins L R, Wang H, Abumrad N, Eaton JW and Tracey K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405(6785):458-462.

Brussino L, Badiu I, Sciascia S, Bugiani M, Heffler E, Guida G, Malinovschi A, Bucca C, Rolla G. Oxidative stress and airway

inflammation after allergen challenge evaluated by exhaled breath condensate analysis. *Clinical & Experimental Allergy* 2010;40:1642-1647.

Burgess JK, Mauad T, Tjin G, Karlsson JC and Westergren-Thorsson G. The extracellular matrix – the under-recognized element in lungdisease?. *J Pathol* 2016; Sep 14.

Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, Lin S-L Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;(188):1294-1302.

Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 2010;138(2 Suppl):4S-10S.

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.

Camargo LN, Righetti RF, Aristóteles LRCRB, dos Santos TM, de Souza FCR, Fukuzaki S, Cruz MM, Alonso-Vale MIC, Saraiva-Romanholo BM, Prado CM, Martins MA, Leick EA and Tibério IFLC. Effects of Anti-IL-17 on Inflammation, Remodeling, and Oxidative Stress in an Experimental Model of Asthma Exacerbated by LPS. *Front. Immunol* 2018;8:1835.

Carr TF, Berdnikovs S, Simon H-U, Bochner BS . Rosenwasser LJ

Eosinophilic bioactivities in severe asthma. *World Allergy Organization Journal* 2016;9:21.

Chakir J, Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, Lin S-L. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1294-1302.

Chakir J, Shannon J, Molet S S, Fukakusa M, Elias J. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(6):1293-1298.

Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, Halayko AJ, Martin JG, Baglole CJ et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *The FASEB Journal* 2012;26:1-9.

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

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-21

Chesn J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M and Magnan A. IL-17 in Severe Asthma Where Do We Stand? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014;90:10.

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-proteasome pathway. *Genes Dev* 1999;9:1586-1597.

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

Chiba Y, Yu Y, Sakai H, Misawa M. Increase in the expression of matrix metalloproteinase-12 in the airways of rats with allergic bronchial asthma. *Biol Pharm Bull* 2007;30(2):318-323.

Chien JW, Lin CY, Yang KD et al. Increased IL-17A secreting CD4 + T cells, serum IL-17 levels and exhaled nitric oxide are correlated with childhood asthma severity. *Clin Exp Allergy* 2013;43:1018-1026.

Choy DF, Hart KM, Lee A, Shikotra BA, Nagarkar DR, Jia SSG, Bradding OCM. TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma. *Sci Transl Med* 2015;301(7):129-301.

Choy DF, Modrek B, Abbas AR, Kummerfeld S, Clark HF, Wu LC, Fedorowicz G, Modrusan Z, Fahy JV, Woodruff PG et al. Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol* 2011;186:1861-1869.

Chu HW, Halliday JL, Martin RJ, Leung DY, Szeffler SJ, Wenzel SE. Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1936-1944.

Chung, KF. Chung, KF Asthma phenotyping: a necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies. *J Intern Med* 2015;279(2):192-204.

Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014;43:343-373.

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

Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004;22:789-815.

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.

Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 2011; 66.

DATASUS Disponível em www.datasus.com.br

Del Maestro RF, Björk J, Arfors KE. Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. II. Role of superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Microvasc Res* 1981;22(3):255-70.

De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 2013;121(24):4930-7.

Doelman CJ, Bast A. Oxygen radicals in lung pathology. *Free Radic Biol Med* 1990;9(5):381-400.

Donnelly R, Yang K, Omary MB, Azhar S, Black JL. Expression of multiple isoenzymes of protein kinase C in airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:253-256.

Dragon S, Hirst SJ, Lee TH, Gounni AS. IL-17A Mediates a Selective Gene Expression Profile in Asthmatic Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50(6):1053-1063.

Dullaers M, R. De Bruyne, F Ramadani, HJ Gould, P Gevaert and BN Lambrecht. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(3):635-645.

Dworski R. Oxidant stress in asthma. *Thorax* 2000;55(Suppl2):S51-3.

Elias JA, et al. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004;22:789-815.

Fajt ML, Wenzel SE. Development of New Therapies for Severe Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016;2092-7355.

Falcai A , Soeiro-Pereira PV, Kubo CA, Aranda CS, Solé D, Condino-Neto A. Peripheral blood mononuclear cells from severe asthmatic children release lower amounts of IL-12 and IL-4 after LPS stimulation. *Allergol Immunopathol* 2015;43(5):482-6.

Famm SS and Morrow JD. The Isoprostanes: Unique Products of Arachidonic Acid Oxidation- A Review. *Curr Med Chem* 2003;10(17):1723-1740.

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

Fodor RS, Georgescu AM, Cioc AD, BIAN Grigorescu BL, Cotoi OS, Fodor P, Copotoiu SM, Azamfirei L. Time- and dose-dependent severity

of lung injury in a rat model of sepsis. *Rom J Morphol Embryol* 2015, 56(4):1329-1337.

Galli SJ, M Tsai, et al. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):445-454.

Gallowitsch-Puerta M and VA. Pavlov. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Life Sci* 2007;80(24-25): 2325-2329.

Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008;11:837-848.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.

GINA. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) [<http://www.ginaasthma.org>] 2017.

Gold LS, Montealegre F et al. Asthma Control and Cost in Latin America. *Value in health regional issues* 2014; 5C:2522-28.

Gori S, Vermeulen M, Remes-Lenicov F, Jancic C, Scordo W, Ceballos A et al., Acetylcholine polarizes dendritic cells toward a Th2-promoting profile. *Allergy* 2017;72(2):221-231.

Grainge CL, Lau LC, Ward JA, Dulay V, Lahiff G, Wilson S, Holgate S, Davies DE, Howarth PH. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med* 2011;364(21):2006-2015.

Graudenz GS, Carneiro DP, Vieira RP. Tendências da mortalidade da asma nas faixas etárias de 0 a 4 anos e 5 a 34 anos no Brasil. *J Bras Pneumol* 2017;43(1):24-31.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 2014;32:659-702.

Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Biol Chem* 1995;270(37):21942-9.

Gubbiotti MA , Vallet SD, Blum R, Iozzo RV. Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions. *Matrix Biol* 2016; 55:7-21.

Haldar, PBrightling, CE, Hargadon B, Gupta S, W Sousa MA, Marshall RP, Bradding P, Green RH., Wardlaw AJ. and Pavord ID. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009;360(10):973-984.

Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid QT. Helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside. *Chest* 2013;143: 494-501.

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.

Hansbro PM , Kaiko GE and Foster PS. Cytokine/anti-cytokine therapy–novel treatments for asthma? *British Journal of Pharmacology* 2011;163(1):81-95.

Hasko G and C Szabo. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. *Biochem Pharmacol* 1998;56(9):1079-1087.

Hassan N, MohamedHussein A, Mohamed E, Mohamed O, Mohamed H, Tammam M. Matrix metalloproteinase- 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1) as non-invasive biomarkers of remodelling in asthma. *European Respiratory Journal* 2015;46:1467.

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

Hesham R. Biological therapy in severe asthma: A gem or a jam. *Egyptian Journal of Bronchology* 2016;(10):1-4.

Hilgers RHP and Webb RC. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. *Exp Biol Med* 2005;230:829-835.

Hocking DC. Fibronectin matrix deposition and cell contractility: implications for airway remodeling in asthma. *Chest* 2002;122(6):275S-278S.

Holgate ST. Inflammatory and structural changes in the airways of patients with asthma. *Respir Med* 2000; 94 Suppl D: S3-6.

Holgate ST, Arshad HS. et al. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci (Lond)* 2010;118(7):439-450.

Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012;18(5):673-683.

Hong Lv Bing Lu , Xing-jia Qian , Jian-an Huang , Tie-feng Qiu. Serum IL-17 & eotaxin levels in asthmatic patients with allergic rhinitis. *Pak J Med Sci* 2016;32(3):700-704.

IMAI T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S and Osamu Yoshieet. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 1997;272(23):15036-15042.

IMAI T. Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigenpresenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol* 1999;11(1):81-88.

James AL, Elliot JG, Jones RL, Mauad T et al. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:1058-1064.

Kalamajski S, Oldberg A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol* 2010;29:248-253.

Kaminska M, Foley S, Maghni K, Storness-Bliss C, Coxson H, Ghezzo H, Lemièrè C, Olivenstein R, Ernst P, Hamid Q, Martin J. Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(1):45-51.

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

Kariyawasam HH, Aizen M, Barkans J, Robinson DS, Kay AB Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:896-904.

Katarzyna G, Malgorzata L, Wioletta Z, Tomasz G. Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: the Role of Matrix Metalloproteinase-9. *Arch. Immunol* 2016;64:47-55.

Katsumata U, Miura M, Ichinose M, Kimura K, Takahashi T, Inoue H, Takishima T. Oxygen radicals produce airway constriction and hyperresponsiveness in anesthetized cats. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(5 Pt 1):1158-61.

Kenyon NJ, Bratt JM. Linderholm AL, Last MS, Last JA. Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: Sources and consequences. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008;230(3):269-275.

Kim RY, Rae B, Neal R, Donovan C, Pinkerton J et al. Elucidating novel disease mechanisms in severe asthma. *Clinical & Translational Immunology* 2016;5:(e91).

Kita H. Eosinophils: multifunctional and distinctive properties. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;161(2):3-9.

Kistemaker LE, Oenema TA, Meurs H and Gosens R. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. *Life Sci* 2012;91(21-22):1126-1133.

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

Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, Huynh ML, Zhou X, Hu H, Wenzel SE. Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(11):1208-15.

Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, Wang Y, Bernstein X, Li JT, Atabai K, Huang X, Sheppard D. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med* 2012;18(4):547-54.

Kumaria A, Dashb D, Singh R. Lipopolysaccharide (LPS) exposure differently affects allergic asthma exacerbations and its amelioration by intranasal curcumin in mice. *Cytokine* 2015;76(2):334-342.

Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, Sproles AA, Dienger K, Budelsky AL, Wills-Karp M Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol* 2010;11:928-935.

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

Lara A, Khatri SB, Wang Z, Comhair SAA, Xu W, Dweik RA, Bodine M, Levison BS, Hammel J, and Bleecker E, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program Alterations of the arginine metabolome in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:673-681

Lee JJ, Dimina D, Macias MP, Ochkur SI, McGarry MP, KR O'Neill, Protheroe C, Pero R, Nguyen T et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 2004;305(5691):1773-1776.

Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IFLC: Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in

an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 2004;34:145-152.

Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:95-102.

Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, Tillie I, Hartmann D, B. Wallaert, A. B. Tonnel and C. Lafuma. Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(4 Pt 1):1298-1307.

Litonjua AA, Sparrow D, Celedon JC, DeMolles D, Weiss ST. Association of body mass index with the development of methacholine airway hyperresponsiveness in men: the Normative Aging Study. *Thorax* 2002; 57:581-585.

Lloyd CM and Hessel ME. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nature Reviews Immunology* 2010;10:838-848.

Lloyd CM, Delaney T, Nguyen T, Tian J, Martinez AC, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. CC chemokine receptor (CCR)3/ eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge in vivo. *J Exp Med* 2000;191:265-274.

1. Lowe APP, RST Nials, AT, Kidd EJ, Broadley KJ and Ford W. R. LPS exacerbates functional and inflammatory responses to ovalbumin and decreases sensitivity to inhaled fluticasone propionate in a guinea pig model of asthma. *British Journal of Pharmacology* 2015;172:2588–2603.

Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *J Clin Invest* 1999;104(8):995-9.

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

Maarsingh H, Bossenga BE, Bos IST, Volders HH, Zaagsma J, and Meurs H. L-arginine deficiency causes airway hyperresponsiveness after the late asthmatic reaction. *Eur Respir J* 2009a; 34:191-199.

Maarsingh H, Zaagsma J, and Meurs H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *Br J Pharmacol* 2009b;158:652-664.

Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, Serafini G, Andreani M, Roncarolo MG and Gregor S. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol* 2011;41:1652-1662

Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *J Allergy Immunol* 2013;31(1):3-10.

Manni ML, Mandalapu S, McHugh KJ, Elloso MM, Dudas PL, Alcorn JF) Molecular Mechanisms of Airway Hyperresponsiveness in a Murine Model of Steroid-Resistant Airway Inflammation. *J Immunol* 2016;196, 963-977.

Manise M, Bakayoko B, Schleich F, Corhay JL and Louis R. IgE mediated sensitisation to aeroallergens in an asthmatic cohort: relationship with inflammatory phenotypes and disease severity. *Int J Clin Pract* 2016;70(7):596-605.

Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *J Allergy Immunol* 2013;31(1):3-10.

Marques RH, Reis FG, Starling CM, Cabido C, de Almeida-Reis R, Dohlnikoff M, Prado CM, Leick EA, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates physical stress-induced lung hyper-responsiveness and oxidative stress in animals with lung inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2012;19(3):158-70.

McGeachie MJ, Yates KP, Zhou X, Guo F, Sternberg AL, Van ML. Genetics and Genomics of Longitudinal Lung Function Patterns in Individuals with Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194(12):1465-1474.

Meurs H, Hamer MAM, 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 MAM, 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.

Michalik M, Pierzchalska M, Legutko A, Ura M, Ostaszewska A, Soja J, Sanak M. Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. *Med Sci Monit* 2009;15(7):194-201.

Milne GL, Yin H, and MorrowJD. Human Biochemistry of the Isoprostane Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283(23):15533-15537.

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.

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

Mintz-Cole RA, Gibson AM, Bass SA, Budelsky AL, Reponen T, Hershey GK. Dectin-1 and IL-17A suppress murine asthma induced by *Aspergillus versicolor* but not *Cladosporium cladosporioides* due to differences in β -glucan surface exposure. *J Immunol* 2012;189(7):3609-17.

Montuschi P, Corradi M, Ciabatonni G, Nightngale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(1):216-20.

Morrow JD. The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des* 2006;2(8):895-902.

Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, and Morris SM, Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum

arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:148-153.

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

Nadeem A, Chhabra SK, Masood A et al. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:72-78.

NAEPP National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP) [<http://www.nhlbi.nih.gov/about/org/naepp>] 2015.

Naik SP, Mahesh PA, Jayaraj BS, Madhunapantula SV, Jahromi SR, Yadav MK. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in asthma. *J Asthma* 2006;26:1-10.

Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang D H, Ray A and Hamid Q. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(2 Pt 1):215-222.

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

Nixon J, Newbold P, Mustelin T, Anderson GP, Kolbeck R. Monoclonal antibody therapy for the treatment of asthma and chronic obstructive

pulmonary disease with eosinophilic inflammation. *Pharmacology & Therapeutics* 2017;169:57-77.

Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, Lory O, Orr-Urtreger, Ehud Lavi A, Brenner T. Activation of the Cholinergic Anti-Inflammatory System by Nicotine Attenuates Neuroinflammation via Suppression of Th1 and Th17 Responses. *J Immunol* 2009;183:6681-6688.

North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasemann H, and Scott JA. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:L911–L920.

O'Neill LA1, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997;20(6):252-8.

Park SJ and Lee YC. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Respir Res* 2010;11:78.

Parulekar, AD Diamant Z, Hanania NA. Role of T2 inflammation biomarkers in severe asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2016;22(1):59-6.

Pera T, Zuidhof A, Valadas J, Smit M, Schoemaker RG, Gosens R, Maarsingh H, Zaagsma J, and Meurs H. Tiotropium inhibits pulmonary inflammation and remodelling in a guinea pig model of COPD. *Eur Respir J* 2011;38:789-796.

Petroni RC, Biselli PJC, Lima TM, Theobaldo MC, Caldini ET, Pimentel RN et al. Hypertonic Saline (NaCl 7.5 %) Reduces LPS-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Inflammation* 2015;38(6):2026-2035.

Pigati PA, Righetti RF, Possa SS, Romanholo BS, Rodrigues AP, dos Santos AS, Xisto DG, Antunes MA, Prado CM, Leick EA, Martins Mde

A, Rocco PR, Tibério I de F. Y-27632 is associated with corticosteroid-potentiated control of pulmonary remodeling and inflammation in guinea pigs with chronic allergic inflammation. *BMC Pulm Med* 2015;15:85.

Pinheiro, NM, Miranda C, Perini A, Camara NO, Costa SK,. Alonso-Vale MI, Caperuto LC, Tiberio IF, Prado MA, Martins MA, Prado VF and Prado CM. Pulmonary inflammation is regulated by the levels of the vesicular acetylcholine transporter. *PLoS One* 2015;10(3): e0120441.

Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, Laprise C and Hamid Q. Pathogenesis of severe asthma. *Clinical & Experimental Allergy* 2012; 42:625-637.

Possa SS, Charafeddine HT, Righetti RF, da Silva PA, Almeida-Reis R, Saraiva-Romanholo BM, Perini A, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério Ide F. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;303(11):L939-52.

Pouladi MA, Robbins CS, Swirski FK, et al. Interleukin-13-dependent expression of matrix metalloproteinase-12 is required for the development of airway eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(1):84-90.

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

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IFLC. Effects of nitric oxide synthases in chronic

allergic airway inflammation and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:457-465.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Capelozzi VL, Martins M A and Tibério IFLC Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 2005a;289:L677-683.

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

Prado MA, Reis RAM, Prado VF, Mello MC, Gomez MV, Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 2002;41:291-299.

Prado VF, Roy A, Kolisnyk B, Gros R and Prado MAM. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochemistry J* 2013;450:265-274.

Price D, Fletcher M, Van Der Molen T. Asthma control and management in 8,000 European patients: the Recognise Asthma and Link to Symptoms and Experience (REALISE) survey. *NPJ Prim Care Respir Med* 2014;24:14009.

Proust B, Proust B, Nahori MA, Ruffie, C. Lefort J. Vargaftig BB. Persistence of Bronchopulmonary Hyper-Reactivity and Eosinophilic Lung Inflammation After Anti-IL-5 or -IL-13 Treatment in Allergic BALB/c and IL-4Ralpha Knockout Mice. *Clin Exp Allergy* 2003;33(1):119-131.

Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995; 268:699-722.

Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol* 1998;275:96-102.

Rao VD. Airway Hyperresponsiveness: An Unsung Clinical Manifestation. *Journal of Allergy & Therapy* 2016; 7:3.

Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, et al. Transforming growth factor- β in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;156:642–47.

Ribeiro-Filho J, Calheiros AS et al. Curine inhibits eosinophil activation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;273(1):19–26.

Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airway. *Thorax* 2003; 58(2):175-82.

Ricciardolo FLM, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Ver* 2004;84(3):731-65.

Richardson JB. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119(5):785-802.

Rigas D, Lewis G, Aron JL, Wang B, Banie H, Sankaranarayanan I, Galle-Treger L, Maazi H, Lo R, Freeman GJ et al. Type 2 innate lymphoid cell suppression by regulatory T cells attenuates airway hyperreactivity and requires inducible T-cell costimulator-inducible T-

cell costimulator ligand interaction. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139, 1468-1477.

Righetti RF, Pigati PA, Possa SS, Habrum FC, Xisto DG, Antunes MA, Leick EA, Prado CM, Martins MM, Rocco PR, Tibério IF. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol* 2014;192:134-46.

Rhoden KJ and Barnes PJ. Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro: role of cyclo-oxygenase and airway epithelium. *Br J Pharmacol* 1989;98(1):325-30.

Rodway GW, Chou J, Hoffman LA, Sethi JM. Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma: clinical implications. *Chron Respir Dis* 2009;6(1):19-29.

Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N and Edwards RH. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(22):10620-10624.

Rosas-Ballina M and Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med* 2011;265(6):663-679.

Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Bérubé J, Olivenstein R, Martin JG, Huot J, Hamid. QFL, Rousseau S. Roussel L, Houle F, Chan IL-17 promotes MAPK dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol* 2010;184:4531-7.

Ruiz Schütz VC, Drewiacki T, Nakashima AS, Arantes-Costa FM, Prado CM, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Tibério IF. Oral tolerance attenuates airway inflammation and remodeling in a model of

chronic pulmonary allergic inflammation. *Respir Physiol Neurobiol* 2009;165(1):13-21.

Saglani S and Lloyd CM. Novel concepts in airway inflammation and remodelling in asthma. *Eur Respir J* 2015;46:1796-1804.

Saluk-Juszczak J; Wachowicz B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochemi* 2005;51(3):280-287,

Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2017;9.

Starkhammar M, Kumlien GS, Swedin L, Dahlén SE, Adner M and Cardell LO. Intranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airway hyperresponsiveness and inflammation via different pathways. *PLoS One* 2012;7(2):e32110.

Starling, CM, Prado CM, Leick-Maldonado EA, Lanças T, Reis FG, Aristóteles LRCRB, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IF. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. *Respir. Physiol Neurobiol* 2009;165(2–3):185-194.

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

Schaller MA, Lundy SK, Huffnagle GB, Lukacs NW. CD8⁺ T cell contributions to allergen induced pulmonary inflammation and airway hyperreactivity. *Eur J Immunol* 2005;35:2061-2070.

Schleich F, Sophie D and Renaud L. Biomarkers in the Management of Difficult Asthma. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2016;16:1561-1573.

Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, Schnyder B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006;203:2715-2725.

Scott L, Li M, Thobani S, Nichols B, Morpew T and Kwong KY. Factors affecting ability to achieve asthma control in adult patients with moderate to severe persistent asthma. *J Asthma* 2016;53(6):644-649.

Shi YH, Shi GC, Wan HY, Jiang LH, Ai XY, Zhu HX et al. Coexistence of th1/th2 and th17/treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:1951-1956.

Shifren A, Witt C, Christie C, Castro M. Mechanisms of remodeling in asthmatic airways. *J Allergy (Cairo)* 2012;316049.

Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng ZHF. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 2008;181:6117-6124.

Starkhammar M, Kumlien Geore'n S, Swedin L, Dahle'n S-E, Adner M, et al. Intranasal Administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c Mice Induces Airway Hyperresponsiveness and Inflammation via Different Pathways. *PLoS ONE* 2012;7(2):e32110.

Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Harle P and Scholmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut* 2006;55(11):1640-1649.

Shein SL, Speicher RH, Proença Filho JO, Gaston B, Rotta AT. Contemporary treatment of children with critical and near-fatal asthma. *Rev Bras Ter Intensiva* 2016;28(2):167-178.

Starkhammar M, Kumlien Georén S, Swedin L, Dahlén SE, Adner M and Cardell LO. In-tranasal administration of poly(I:C) and LPS in BALB/c mice induces airwayhyperresponsiveness and in-flammation via different pathways. *PLoS One* 2012;7(2):e32110.

Stuart JH, Twort CHC, and Tak HL. Differential Effects of Extracellular Matrix Proteins on Human Airway Smooth Muscle Cell Proliferation and Phenotype. *Am J Respir Cell Mol. Biol* 2000;23:335344.

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

Taher YA, Henricks PA, van Oosterhout AJ Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement. *Libyan J Med* 2010;5.

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.

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

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.

Tai A, Tran H, Roberts M, et al. The association between childhood asthma and adult chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2014;69:805-810.

Tan H, Pan P, Zhang L, Cao Z, Liu B, Li H, Su X Nerve growth factor promotes expression of costimulatory molecules and release of cytokines in dendritic cells involved in Th2 response through LPS-induced p75NTR. *The Journal of Asthma* 2016;53:989-998.

Tillie-Leblond P, Gosset P, Tonnel B. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy* 2005;60:23-29

Toledo AC, Sakoda CP, Perini A, Pinheiro NM, Magalhães RM, Grecco S, Tibério IF, Câmara NO, Martins MA, Lago JH, Prado CM. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Br J Pharmacol* 2013;168(7):1736-49.

Törmänen KR, Uller L, Persson CG, and Erjefält JS. Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;17:19-25.

Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax* 2006;61:202-8.

Tufvesson E, Andersson C, Weidner J, Erjefält JS, Björner L. Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the alveolar compartment of asthmatic patients. *Allergy & Clinical Immunology* 2016;72(4):627-635.

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

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.

Übel C, Graser A, Koch S, Rieker RJ, Lehr HA, Mathias Müller & Susetta Finotto. Role of Tyk-2 in Th9 and Th17 cells in allergic asthma. *Scientific Reports* 2014;4:5865.

Van Rensen EL, Evertse CE, Van Schadewijk WA, van Wijngaarden S, Ayre G, Mauad T, Hiemstra PS, Sterk PJ, Rabe KF. Eosinophils in bronchial mucosa of asthmatics after allergen challenge: effect of anti-IgE treatment. *Allergy* 2009;64(1):72-80.

Varricchi G, Bagnasco D, Borriello F, Heffler E, Canonica GW. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016;16,186-200.

Venancio TM, Machado RM; Castoldi A, Amano MT, Nunes VS, Quintao ECR, Camara NOS; Soriano FG, and Cazita P. CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis. *Mediators of Inflammation* 2016;2016:12.

Vroman H, Blink B, Kool M. Mode of dendritic cell activation: The decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology* 2015; 220(2):254-261.

Vignola, AM, Mirabella F, Costanzo G, Giorgi RD, Gjomarkaj M, Bellia V and Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003;123(3 Suppl):417s-422s.

Vonk JM, Postma DS, Maarsingh H, Bruinenberg M, Koppelman GH, and Meurs H. Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and beta2 agonist and steroid response. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:179-186.

Voynow JA, and Kummarapurugu A. Isoprostanes and Asthma. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810(11):1091-1095.

Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1023-32.

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

Wang RS, Jin HX, Shang SQ, Liu XY, Chen SJ, Jin ZB Associations of IL-2 and IL-4 Expression and Polymorphisms With the Risks of Mycoplasma pneumoniae Infection and Asthma in Children. *Arch Bronconeumo* 2015;51(11):571-8.

Wang YH, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11(5):388-94.

Warner RL, Lukacs NW, Shapiro SD, et al. Role of metalloelastase in a model of allergic lung responses induced by cockroach allergen. *Am J Pathol* 2004;165(6):1921-1930.

Way EE, Chen K, Kolls JK Dysregulation in lung immunity — The protective and pathologic Th17 response in infection. *Eur J Immunol* 2013;43,3116-3124.

Wegmann M. The Role of Neutrophils and TH17 Cells in the Immunopathology of Severe Asthma”. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)* 2011;10(15):427-441

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

Weitoft M, Andersson C , Andersson-Sjöland A , Tufvesson E , Bjermer L , Erjefält J and Westergren-Thorsson G. Controlled and uncontrolled asthma display distinct alveolar tissue matrix compositions. *Respiratory Research* 2014;15:67.

Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1001-1008.

Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clinical& Experimental Allergy* 2012;42:650-658.

Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012;18(5):716-25.

Wenzel SE. Complex phenotypes in asthma: current definitions. *Pulm Pharmacol Ther* 2013;26(6):710-5.

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

Willis CR, Siegel L, Leith A, Mohn D, Escobar S, Wannberg S, Misura K, Rickel E, Rottman JB3, Comeau MR, Sullivan JK, Metz DP, Tocker J, Budelsky AL. IL-17RA Signaling in Airway Inflammation and Bronchial Hyperreactivity in Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;53(6):810-21.

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

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.

Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, Koth LL, Arron JR, Fahy JV. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180, 388-95.

Wu G, Morris S.M, Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa E Silva JR, Negri EM, Mauad T. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336(Pt 1):1-17.

Wu, G. Fedorowicz,Z. Modrusan, J. V. Fahy, P. G. Woodruff, J. R. Arron, Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol* 2011;186:1861–1869.

Xião W. Advances in NF-κB Signaling Transduction and Transcription. *Cellular & Molecular Immunology* 2004;6:425-436.

Yang T, Li Yan, Lyu Z, Huang K, Corrigan CJ, Ying S, Wang W, Wang C. Characteristics of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Airways of Asthmatics: Relationships with Disease Severity and Infiltration of Inflammatory Cells. *Chin Med J (Engl)* 2017;130(17):2033-2040.

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

Yeganeh B, Xia C, Movassagh H, Koziol-White C, Chang Y, Al-Alwan L et al. Emerging mediators of airway smooth muscle dysfunction in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2013;26:105-111.

Zar HJ and Levin ME. Challenges in treating pediatric asthma in developing countries. *Paediatr Drugs* 2012;Dec 14(6):353-9.

Zhang J, Chen X, Liu T, Jiang S. FOXP3+ associated with the pro-inflammatory regulatory T and T helper 17 effector cells in asthma patients. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2016;12:2753-2758.

Zhang C, Song Y, Wang C, Zhao L, Kang H, Ma X, Wang J, Zhang T, Shumin W, Ma C. The effects of chrysophanol on ovalbumin (OVA)-induced chronic lung toxicology by inhibiting Th17 response. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2017;27:5.

Zhao Y, Yang J, Gao YD. Altered expressions of helper T cell (Th)1, Th2, and Th17 cytokines in CD8(+) and $\gamma\delta$ T cells in patients with allergic asthma. *J Asthma* 2011;48(5):429-36.

Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, and Foster PS, et al. Dissection of

experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest* 2003;111:1863-1874.