

**CLAUDIA MIRANDA STARLING**

**Estudo da mecânica oscilatória e do remodelamento  
de tecido pulmonar  
periférico em modelo de inflamação alérgica em  
cobaias: efeitos da inibição da óxido  
nítrico sintase induzida**

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

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

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

São Paulo  
2008



**“SE PENSAR É O DESTINO DO SER HUMANO, CONTINUAR SONHANDO É O SEU GRANDE DESAFIO. E APESAR DA TRAJETÓRIA COM RISCOS, APRENDI QUE OS SONHOS TRANSFORMAM A VIDA NUMA GRANDE AVENTURA. ELES NÃO DETERMINAM AONDE VOCÊ VAI CHEGAR, MAS PRODUZEM A FORÇA NECESSÁRIA PARA ARRANCÁ-LO DO LUGAR EM QUE VOCÊ ESTÁ”.**

**AUGUSTO CURY**

À Edna A. Leick-Maldonado,

Pela cooperação e orientação em todas as fases dos experimentos. E pela paciência em ensinar. Você tornou essa jornada mais divertida e leve!!!

À Rosana,

Mais que secretária deste laboratório, uma amiga! Com certeza, além de sua competência na resolução dos problemas diários, sua amabilidade com todos, faz do nosso local de trabalho, um lugar melhor.

Aos amigos, "companheiros sofredores" da Pós-graduação:

-Patrícia Angeli: a amiga que o destino me deu a felicidade de reencontrar aqui na pós; agradeço não só pela tua amizade, mas pela sua generosidade e desprendimento nos muitos momentos difíceis desta jornada e de tantas outras... Torço pela sua felicidade...sempre!!!

-Ricardo Marques: meu amigo de fé... Presente em tantos momentos de minha vida, obrigada por tornar essa caminhada mais divertida; tenha certeza que você está guardado no lado esquerdo do peito e de que, nesta vida, tem coisas que não tem preço...

-Luciana Rolim: os outros 50% da minha equipe, minha companheira de experimento; obrigada pelo seu apoio e amizade...

-Rafael, meu "brother"... obrigada pelos bons momentos no lab...

-Fabiana, companheira de experimentos, obrigada por dividir comigo as angústias da vida profissional e experimental...

-Ana Cecília e Clarice, obrigada pela leveza dos papos de corredor e pela amizade ao longo deste trabalho...

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Bolsa de Mestrado: Processo 06/57942-4R

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1.	INTRODUÇÃO.....	02
1.1	ÓXIDO NÍTRICO.....	02
1.1.1	ASPECTOS GERAIS .....	02
1.1.2	ÓXIDO NÍTRICO E O SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO PULMONAR ..	07
1.1.3	EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA ASMA BRÔNQUICA .....	09
1.1.4	ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO .....	13
1.2	ASMA BRÔNQUICA.....	19
1.2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	19
1.2.2	DEFINIÇÃO.....	23
1.2.3	FATORES DE RISCO .....	23
1.2.4	FISIOPATOLOGIA.....	27
1.3	REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR: DENSIDADE DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS .....	31
1.4	O PAPEL DO PARÊNQUIMA PULMONAR NA FISIOPATOLOGIA DA ASMA .....	38

1.5	AVALIAÇÃO DA MECÂNICA OSCILATÓRIA DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO .....	41
1.6	JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO .....	42
2.	OBJETIVOS .....	46
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
3.1.	ANIMAIS .....	48
3.2.	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	49
3.3.	PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO .....	50
3.4.	TRATAMENTO COM 1400W .....	52
3.5.	PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE MECÂNICA OSCILATÓRIA DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO .....	52
3.6.	ESTUDO MORFOMÉTRICO DO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	57
3.6.1	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS .....	59
3.6.2	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE INOS .....	59
3.6.3	AVALIAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS .....	61
3.6.4	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE ACTINA .....	62
3.6.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE 8-EPI-PGF <sub>2</sub> $\alpha$ .....	63
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	64
4.	RESULTADOS .....	66
4.1	TEMPO DE INALAÇÃO .....	66
4.2	AVALIAÇÃO DA MECÂNICA OSCILATÓRIA PULMONAR .....	68
4.3	ESTUDO MORFOMÉTRICO DO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	70
4.3.1	AVALIAÇÃO DE PROPORÇÃO DE ESTRUTURAS .....	70
4.3.2	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS .....	71

4.3.3	AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS POSITIVAS PARA INOS .....	71
4.3.4	AVALIAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS .....	74
4.3.5	AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE ACTINA ..	76
4.3.6	AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE 8-EPI-PGF2 $\alpha$ .....	76
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS .....	79
4.5	CORRELAÇÃO .....	83
5.	DISCUSSÃO .....	85
6.	CONCLUSÃO .....	97
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DE FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO/NITROGÊNIO E ISOPROSTANOS .....	15
FIGURA 2 - MAPA MUNDIAL DE PREVALÊNCIA DE ASMA .....	22
FIGURA 3 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA FISIOPATOLOGIA DA ASMA BRÔNQUICA ..	28
FIGURA 4 - ESQUEMA DA FORMAÇÃO E METABOLISMO DA ARGINASE.....	37
FIGURA 5 - ESQUEMA DO PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO UTILIZADO .....	51
FIGURA 6 - APARATO EXPERIMENTAL .....	56
FIGURA 7 - ESQUEMA DA AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA .....	58
FIGURA 8 - TEMPO DE INALAÇÃO .....	67
FIGURA 9 - PORCENTAGEM DE AUMENTO DE RESPOSTA DE MECÂNICA OSCILATÓRIA PULMONAR .....	69
FIGURA 10 - VALORES DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	72
FIGURA 11 - VALORES DA DENSIDADE DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS POSITIVAS PARA A EXPRESSÃO DE INOS NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	73
FIGURA 12 - PROPORÇÃO DE VOLUME DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	75
FIGURA 13 - PROPORÇÃO DE VOLUME DE ACTINA NO PARÊNQUIMA PULMONAR ...	77
FIGURA 14 - PROPORÇÃO DE VOLUME DE 8-EPI-PGF2A NO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	78

FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIAS DE PARÊNQUIMA PULMONAR CORADAS COM LUNA E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE INOS E 8-EPI-PGF2A EM ANIMAIS CONTROLE (SF) E SENSIBILIZADOS QUE RECEBERAM OU NÃO TRATAMENTO COM 1400W .....	80
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIAS DE PARÊNQUIMA PULMONAR CORADAS COM PICO-SÍRIUS, RESORCINA-FUCSINA DE WEIGERT E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE ACTINA EM ANIMAIS CONTROLE (SF) E SENSIBILIZADOS QUE RECEBERAM OU NÃO TRATAMENTO COM 1400W .....	82

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO E A EXPRESSÃO DA ASMA .....	26
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1- PROPORÇÃO DE ESTRUTURAS DA FATIA DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO .....	70
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%Et</b>	Porcentagem de aumento da elastância tecidual
<b>%Rt</b>	Porcentagem de aumento da resistência tecidual
<b>1400W</b>	N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamidine - inibidor específico da iNOS
<b>8-iso-PGF-2<math>\alpha</math></b>	Principal membro da classe F2-isoprostano
<b>b-FGF</b>	Fator de crescimento do fibroblasto básico
<b>CAT</b>	Sistema de Transporte Aminoácido Catiônico
<b>CCR2 e CCR3</b>	Receptores de quimiocinas
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Endotelial
<b>EP</b>	Erro padrão
<b>Et</b>	Elastância tecidual
<b>GINA</b>	Global Initiative National of Asthma
<b>GMPc</b>	Guanosina Monofosfato Cíclica
<b>Grupo OVA</b>	Animais que receberam inalações com ovoalbumina e soro fisiológico 0,9% estéril i.p.
<b>Grupo OVA-W</b>	Animais que receberam inalações com ovoalbumina e tratamento com 1400W i.p.
<b>Grupo SF</b>	Animais que receberam inalações com soro fisiológico 0,9% estéril e soro fisiológico 0,9% estéril i.p
<b>Grupo SF-W</b>	Animais que receberam inalações com soro fisiológico e tratamento com 1400W i.p.
<b>GSF</b>	Fator estimulador de colônia – granulócito
<b>HE</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>i.p.</b>	Intra-Peritoneal
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL</b>	Interleucina

<b>iNANC</b>	Componente inibitório do sistema não-adrenérgico não-colinérgico
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>L-NAME</b>	L-NG-nitroarginina metil ester
<b>MCP-1 e MIP-1<math>\alpha</math></b>	Citocinas pró-fibróticas pulmonares
<b>MMP</b>	Metaloproteinases de matriz que degradam colágeno
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>NaCl 0,9%</b>	Soro fisiológico - SF
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
<b>NANC</b>	Sistema não-adrenérgico não-colinérgico
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOex</b>	Óxido nítrico exalado
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintases
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OVA</b>	Ovoalbumina
<b>PDGF</b>	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGD2</b>	Prostaglandinas D2
<b>PGE2</b>	Prostaglandinas E2
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>Rt</b>	Resistência tecidual
<b>SF</b>	Soro Fisiológico
<b>Strip</b>	Fatia de tecido pulmonar
<b>TGF-beta</b>	Fator Transformador do Crescimento-Beta
<b>TI</b>	Tempo de inalação
<b>TIMPs</b>	Inibidores teciduais de metaloproteinases
<b>VEF<sub>1</sub></b>	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
<b>VIP</b>	Peptídeo vasoativo intestinal

Starling CM. *Estudo da mecânica oscilatória e do remodelamento de tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação alérgica em cobaias: efeitos da inibição da óxido nítrico sintase induzida* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. (123 páginas)

**INTRODUÇÃO:** A importância do parênquima pulmonar na piora funcional da asma tem sido recentemente investigada. Embora a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) amplifique a responsividade e o remodelamento das vias aéreas induzidos pela inflamação crônica, seu efeito no parênquima pulmonar não foi previamente estudado. **OBJETIVO:** Avaliar a influência do óxido nítrico derivado da iNOS na mecânica pulmonar, na inflamação e no processo de remodelamento no tecido pulmonar periférico de cobaias com inflamação pulmonar alérgica. **MÉTODOS:** Os animais foram submetidos a sete inalações com doses crescentes de ovalbumina (1~5 mg/mL) ou soro fisiológico por 4 semanas. As cobaias receberam 1400-W (inibidor específico de iNOS, intraperitoneal) ou veículo por 4 dias, iniciando 30 minutos antes da sétima inalação. Após 72h da sétima inalação, os animais foram anestesiados, exsanguinados e fatias de tecido pulmonar periférico foram retiradas e suspensas em banho orgânico de Krebs, e a resistência e elastância tecidual foram avaliadas em condição basal e após desafio com ovalbumina. Após, as fatias de tecido pulmonar periférico foram submetidas à avaliação histopatológica. **RESULTADOS:** Os animais expostos às inalações com ovalbumina apresentaram valores maiores de porcentagem de aumento da resistência e da elastância tecidual em relação ao basal após desafio com ovoalbumina no banho ( $p < 0.05$ ). Houve aumento no número de eosinófilos ( $p < 0.001$ ), nas células iNOS positivas ( $p < 0.001$ ), na deposição de fibras elásticas e colágenas ( $p < 0.05$ ), na densidade de actina ( $p < 0.05$ ) e na expressão de 8-epi-PGF $2\alpha$  ( $p < 0.001$ ) no septo alveolar. A administração de 1400-W reduziu todos estes parâmetros funcionais e morfológicos ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSÕES:** Neste modelo experimental, o bloqueio específico da iNOS atenuou a constrição, a inflamação e o remodelamento no parênquima pulmonar. Estas alterações podem estar relacionadas aos efeitos do óxido nítrico na modulação da via do estresse oxidativo. O presente estudo sugere que a inibição específica da iNOS pode amplificar as estratégias terapêuticas utilizadas na abordagem de doenças inflamatórias crônicas pulmonares.

Descritores: 1. Óxido nítrico sintase/antagonistas e inibidores 2. Asma  
3. Cobaias 4. Ovoalbumina 5. Broncoconstrição 6. Colágeno

Starling CM. *Oscillatory mechanics and periphery lung tissue remodeling study in an allergic inflammation model in guinea pigs: effects of inducible nitric oxide synthase inhibition* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. (123 pages)

**INTRODUCTION:** The importance of lung parenchyma in functional asthma impairment has been recently addressed. Although the inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation amplifies chronic inflammation-induced airway responsiveness and remodeling, its effect on lung parenchyma has not been previously investigated. **OBJECTIVE:** To evaluate the influence of iNOS-derived NO in the pulmonary mechanics, inflammation, and remodeling processes in peripheral lung tissue of guinea pigs with pulmonary allergic inflammation. **METHODS:** Animals were submitted to seven ovalbumin exposures with increasing doses (1~5 mg/mL) or saline for 4 weeks. The guinea pigs received 1400-W (iNOS-specific inhibitor, intraperitoneal) or vehicle for 4 days, beginning 30 minutes before the 7<sup>th</sup> inhalation. At 72h after the 7<sup>th</sup> inhalation, animals were anesthetized, exsanguinated and peripheral lung tissue strips were retreat and suspended in a Krebs organ bath, and the tissue resistance and elastance were evaluated at baseline condition and after ovalbumin challenge. After that, strips were submitted to histopathological evaluation. **RESULTS:** The ovalbumin-exposed animals presented greater values of percentage of increase of tissue resistance and elastance related to baseline after ovalbumin challenge in the bath ( $p < 0.05$ ). There were increase in the number of eosinophils ( $p < 0.001$ ) and iNOS-positive cells ( $p < 0.001$ ), in collagen and elastic fiber deposition ( $p < 0.05$ ), in actin density ( $p < 0.05$ ) and in 8-epi-PGF2 $\alpha$  expression ( $p < 0.001$ ) in the alveolar septa. The 1400-W administration reduced all these functional and morphological parameters ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** In this experimental model, the iNOS-specific blockage attenuated constriction, inflammation, and remodeling in the lung parenchyma. These alterations may be related to NO effects in the modulation of the oxidative stress pathway. The present study suggests that specific iNOS inhibition can amplify the therapeutics strategies used in the management in chronic inflammatory lung diseases.

Descritores: 1. nitric oxide synthase/antagonists & inhibitors 2. Asthma  
3. Guinea pigs 4. Ovalbumin 5. Broncoconstriction 6. Collagen

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. ÓXIDO NÍTRICO**

#### **1.1.1. ASPECTOS GERAIS**

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira que desempenha um importante papel em muitos processos fisiológicos e patológicos, além de regular uma variedade de funções dentro das células e tecidos, como vasodilatação, neurotransmissão e processos imunológicos (Ricciardolo, 2003; Ricciardolo et al., 2004). Sabe-se que o NO participa na patogênese da asma brônquica, porém sua participação no processo inflamatório ainda vem sendo estudada.

O NO atua como um neurotransmissor do sistema i-NANC (componente inibitório do sistema não-adrenérgico não-colinérgico) com ação relaxante sobre o músculo liso das vias aéreas (Ricciardolo, 2003), podendo ser encontrado em abundância no sistema nervoso central e periférico (Knowles et al., 1989) e como um neurotransmissor clássico na regulação da motilidade gastrointestinal, fluxo sanguíneo regional e função neuroendócrina. No cérebro, ele exerce influência na formação da memória e na intensidade das respostas a estímulos dolorosos (Christopherson e Bredt, 1997). Além disso, Kobzik et al. (1994) mostraram que o óxido nítrico está presente na musculatura esquelética regulando tanto o metabolismo

como a contratilidade muscular. Em grandes concentrações pode ter efeito citotóxico e citostático atuando na defesa do organismo contra tumores e patógenos (Moncada e Higgs, 1993; Ricciardolo et al., 2004).

Em pacientes com asma brônquica, o aumento da concentração de NO formado pela enzima NO sintase induzida (iNOS), presente em várias células inflamatórias, determina hiperemia, edema e exsudação, contribuindo para o estreitamento da luz das vias aéreas nestes pacientes (Ricciardolo et al., 2004).

Além disso, Baraldi et al. (1997) demonstraram que o óxido nítrico exalado (NO<sub>ex</sub>) encontra-se aumentado em crianças portadoras de asma, principalmente durante as exacerbações e que o uso de terapia antiinflamatória leva à sua diminuição.

O NO é um gás altamente lábil e de meia-vida curta (1-5 segundos) pela sua capacidade de ligação com o oxigênio (O<sub>2</sub>) e com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Difunde-se livremente nos tecidos por ser solúvel tanto em água como em lipídios, apresentando uma ação típica de segundo mensageiro para células-alvo (Ricciardolo et al., 2006).

É gerado a partir da quebra do grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina por meio de oxidação enzimática (Moncada et al., 1989; Tayeh e Marletta, 1989; Ignarro, 2002), onde há a liberação do NO e da L-citrulina. (Culotta e Koshland, 1992; Moncada e Higgs, 1993). A L-arginina, precursora de NO, é transportada para dentro das células, via

sistema de transporte aminoácido catiônico (CAT) e pode ser metabolizada por dois grupos distintos de enzimas: as óxido nítrico sintases (NOS) e a arginase.

As óxido nítrico sintase convertem a L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina utilizando a NG-hidroxi-L-arginina como intermediário, que por sua vez diminui a atividade da arginase. A L-citrulina pode ser convertida pelo argininosucinato em L-arginina, enquanto a arginase tem a capacidade de metabolizar a L-arginina em L-ornitina (Ricciardolo et al., 2004). Este processo requer oxigênio como um co-substrato e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como fonte de elétrons para transformar a L-arginina em L-citrulina e assim liberar o óxido nítrico (Ricciardolo et al., 2004).

Funcionalmente, as isoformas da enzima óxido nítrico sintase existem em três tipos, sendo duas delas constitutivas e uma induzida: a isoforma neuronal ou tipo I (nNOS) (Bredt e Snyder, 1989; Bredt et al., 1990), a isoforma induzida ou tipo II (iNOS) (Xie et al., 1992; Hamid et al., 1993) e a isoforma endotelial ou tipo III (eNOS) (Lamas et al., 1992). Todas as três isoformas de NOS estão expressas nas vias aéreas (Fischer et al., 1993; Hamid et al., 1993; Kobzik et al., 1993).

As isoformas constitutivas (nNOS e eNOS) estão presentes normalmente em situações fisiológicas e são enzimas cálcio-dependente, capazes de produzir baixas quantidades de óxido nítrico. A isoforma eNOS

produz óxido nítrico no endotélio vascular sob condições basais e apesar de sua expressão ser restrita as células endoteliais vasculares, existem relatos da sua localização no hipocampo, sendo sua expressão em humanos significativamente suprimida pela hipóxia (Wong e Marsden, 1996). O óxido nítrico formado a partir desta enzima é responsável por manter o tônus vascular baixo e prevenir a aderência leucocitária e de plaquetas na parede vascular (Ignarro, 2002).

A isoforma nNOS está presente, principalmente nos neurônios (Vizzard et al., 1995) e nervos, porém já foi também encontrada na musculatura lisa das vias aéreas (Patel et al., 1999), nas células epiteliais (Asano et al., 1994) e em células inflamatórias na parede de vias aéreas (Prado et al., 2005a). O óxido nítrico derivado desta isoforma atua como neuromodulador e/ou neuromediador tanto em nível central como periférico, agindo na regulação central da pressão sangüínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação, via nervos periféricos. Também regula o fluxo sangüíneo cerebral local e está envolvida na formação da memória (Förstermann et al., 1994). No pulmão, a isoforma nNOS atua nas terminações nervosas dos nervos do sistema não-adrenérgico não-colinérgico, particularmente como mediador do sistema i-NANC (Bult et al., 1990; Li e Rand, 1991; Belvisi et al., 1991; Imasaki et al., 2001), causando broncodilatação na musculatura lisa das vias aéreas.

Por outro lado, a isoforma induzida está presente principalmente em situações patológicas e sua estimulação produz grandes quantidades de

óxido nítrico. A presença desta isoforma foi demonstrada inicialmente em macrófagos, no entanto, sabe-se que pode atuar em uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo o endotélio vascular, desempenhando, assim, funções múltiplas na resposta inflamatória (Meng et al., 2000; Birrell et al., 2003; Offer et al., 2003). Ao contrário das isoformas constitutivas, a iNOS não depende de cálcio para ativação, mas a síntese de mRNA da iNOS é necessária para sua atividade, sendo sua atividade mantida por mais de 24 horas (Adams et al., 1996).

Deste modo, o aumento da produção de NO na asma por meio das isoformas constitutivas (nNOS e eNOS) apresenta uma ação primariamente benéfica (agente protetor) por sua ação broncodilatadora (Hogman et al., 1993), enquanto a isoforma induzida (iNOS) apresenta uma ação tóxica, a qual exacerba, perpetua e amplifica a inflamação (Xiong et al., 1999; Ricciardiolo et al., 2004). A citotoxicidade do NO resulta, então, da sua ação direta, da sua concentração local, da enzima pela qual foi produzido e/ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (Schuling et al., 1998).

Com o grande número de estudos que avaliaram a presença de iNOS em diversos órgãos, sabe-se que esta isoforma pode estar presente em diferentes tipos celulares, incluindo as células epiteliais (Guo et al., 1995), os macrófagos (Hibbs et al., 1987; Watanabe e Kakuta, 2002), os neutrófilos (McCall et al., 1991; Cerchiaro et al., 2001), os eosinófilos (Del Pozo et al.,

1997; Prado et al., 2005a) e as células linfomononucleares (Prado et al., 2005b).

No trato respiratório, a expressão de iNOS tem sido demonstrada nas células epiteliais alveolares (Warner et al., 1995), nos fibroblastos (Romanska et al., 2002), em células do músculo liso das vias aéreas e vasos (Griffith et al., 1995; Thomae et al., 1993), nas células epiteliais das vias aéreas (Adcock et al., 1994; Pechkovsky et al., 2002; Robbins et al., 1994; Watkins et al., 1997), nos mastócitos (Gilchrist et al., 2002), nas células endoteliais (Ermer et al., 2002), nos neutrófilos (Blackford et al., 1994) e em condrócitos (Kobzik et al., 1993). A expressão de iNOS no trato respiratório pode ser reduzida pelo uso de corticoterapia (Haddad et al., 1995).

### **1.1.2. ÓXIDO NÍTRICO E O SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO PULMONAR**

O sistema nervoso autônomo pulmonar é composto por três componentes principais: o adrenérgico, o colinérgico e o sistema não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) (Kaliner et al., 1991). O sistema NANC, demonstrado apenas no final da década de 60, é composto de um conjunto de fibras sensitivas não-mielinizadas cujos processos terminais atingem as células epiteliais, vasos, musculatura lisa peribrônquica e glândulas submucosas. As fibras parassimpáticas do sistema NANC correspondem à primeira inervação responsável pelo relaxamento do músculo liso das vias aéreas na maioria dos mamíferos, incluindo humanos.

É formado por um componente inibitório cuja estimulação causa broncodilatação (i-NANC) e outro excitatório (e-NANC), que, ao ser ativado, induz a broncoconstrição.

O relaxamento produzido pelos nervos parassimpáticos no pulmão é mediado pelo NO e/ou pelo peptídeo vasoativo intestinal (VIP), do sistema i-NANC (Widdicombe, 1998), enquanto a substância P e a neurocinina A respondem como principais mediadores do sistema e-NANC (excitatório).

Sugere-se que a L-arginina/óxido nítrico pode estar envolvida na neurotransmissão NANC e que o óxido nítrico endógeno pode ser um neurotransmissor das respostas i-NANC (Bult et al., 1990; Li e Rand, 1991). Como os efeitos i-NANC são produzidos pela estimulação nervosa colinérgica, sugere-se que o óxido nítrico possa ser co-liberado com acetilcolina e atuar como um atenuador no reflexo de broncoconstrição colinérgico.

Além das evidências que indicam que o NO age como neurotransmissor do sistema i-NANC, a neurotransmissão nitrérgica tem sido mostrada não apenas nas vias aéreas, mas também no intestino, na bexiga e em órgãos reprodutivos de cobaias e humanos (Barnes e Belvisi, 1993).

Neste sentido, Branko et al. (2002), após utilização de inibidores das NO sintases, avaliaram a tensão do músculo liso em anéis de traquéia de cobaias e demonstraram que os nervos parassimpáticos não-colinérgicos

modulam o tônus do músculo liso das vias aéreas e que parte desse efeito é dependente do NO, demonstrando que o NO é um dos vários transmissores potenciais que mediam as respostas parassimpáticas não-colinérgicas.

Além disso, estudos prévios indicam que os nervos pré e pós-ganglionares parassimpáticos, mediam contrações e relaxamentos do músculo liso das vias aéreas (Canning et al., 1993), cujas vias estão sujeitas as diferentes ativações reflexas (Canning et al., 1997). Em um estudo da inervação parassimpática de vias aéreas de cobaias, foi demonstrado que os nervos colinérgicos aumentam o tônus das vias aéreas, tanto proximais quanto distais (Kesler et al., 1999).

### **1.1.3. EFEITOS FISIOPATOLÓGICOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA ASMA BRÔNQUICA**

O papel do óxido nítrico na fisiopatogenia da asma brônquica não é tão simples e, apesar dos inúmeros estudos *in vitro*, em modelos experimentais e em humanos, os resultados encontrados na literatura parecem ainda bastante controversos, dependendo do modelo utilizado, da espécie animal, do tipo de inibidor da enzima óxido nítrico sintase utilizado, bem como dos parâmetros avaliados.

Autores sugerem que a disfunção das enzimas óxido nítrico sintases parece exercer tanto efeito benéfico quanto maléfico (Xiong et al., 1999; Ricciardolo et al., 2004; Meurs et al., 2003), alterando aspectos relevantes

da patologia da asma, particularmente do recrutamento de células inflamatórias (Schuiling et al., 1998; Prado et al., 2005a, b; Leick-Maldonado et al., 2003), da hiperresponsividade das vias aéreas (Meurs et al., 2002), e, mais recentemente, do processo de remodelamento (Hogaboam et al., 1998; Ricciardolo, 2003, Ricciardolo et al., 2004; Prado et al., 2006).

Assim, por meio de atuação nos nervos do sistema NANC, o NO derivado da enzima nNOS apresenta efeito benéfico por causar broncodilatação. No entanto, o óxido nítrico derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação nas arteríolas, com conseqüente extravasamento de plasma e edema (Ricciardolo et al., 2004).

Além disso, estudando efeitos agudos da inibição da produção do óxido nítrico no mesmo modelo de inflamação crônica de vias aéreas em cobaias utilizado neste estudo, Prado et al. (2005b) demonstraram que o tratamento com L-NAME em animais sensibilizados reduz o número de células linfomononucleares e polimorfonucleares ao redor das vias aéreas, atribuindo ao óxido nítrico um papel de mediador pró-inflamatório neste modelo.

Por outro lado, sabe-se que na asma, há uma grande quantidade de óxido nítrico proveniente da enzima iNOS, o que resulta em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento de secreção do muco e ativação indireta de células Th2, principalmente por recrutamento eosinofílico, contribuindo para o agravamento da inflamação (Barnes, 1996).

Entre as funções que o óxido nítrico (oriundo da iNOS) pode desempenhar, destaca-se também um importante papel pró-inflamatório, auxiliando no recrutamento de células inflamatórias para o local da injúria. Além disso, tem sido bastante discutido recentemente, que o óxido nítrico produzido pelas próprias células inflamatórias possa estar influenciando a resposta inflamatória agindo como amplificador (Ricciardolo, 2003; Prado et al., 2005; Leick-Maldonado et al., 2004).

Embora diversos estudos enfatizem o papel do NO como broncodilatador de vias aéreas proximais, poucos trabalhos avaliaram o papel do NO como modulador do tônus de vias aéreas distais. Larsson et al. (2005), avaliando o tecido periférico após inibição das NO sintases, observaram que cobaias sensibilizadas apresentavam aumento da contração do parênquima pulmonar, demonstrando que o NO apresenta um efeito protetor também no parênquima pulmonar.

Ainda neste contexto, Feletou et al. (2001) avaliaram o papel das enzimas NO sintases na hiperresponsividade por pletismografia em ratos normais e em ratos geneticamente modificados para não expressarem a eNOS (eNOS<sup>-/-</sup>). Os autores demonstraram que a isoforma iNOS pode estar atuando no controle da responsividade brônquica nos ratos eNOS<sup>-/-</sup>, uma vez que foi detectado um aumento da quantidade de iNOS no epitélio brônquico, além de aumento na expressão de mRNA para iNOS na traquéia, tecido pulmonar e tecido cerebral. Estes achados demonstram que as três

isoformas são constitutivamente expressas no pulmão de ratos e que sua localização anatômica sugere também uma função específica.

Além disso, a inflamação persistente nas vias aéreas, observada na asma, pode levar às mudanças estruturais conhecidas como remodelamento e, conseqüentemente, levar à obstrução das vias aéreas, que passa a não ser mais completamente reversível, além de poder associar-se à progressiva perda da função pulmonar a longo prazo. Estas alterações podem ser, pelo menos em parte, mediadas pelo óxido nítrico (Prado et al., 2005b, Prado et al., 2006, Angeli et al., 2008).

Neste sentido, em estudo comparando o efeito do L-NAME administrado de forma aguda e crônica, foi demonstrado que o óxido nítrico pode ter um efeito protetor no remodelamento, pois sua inibição com L-NAME crônico aumentou o depósito de colágeno nas vias aéreas (Prado et al., 2005). Os autores sugerem que o NO derivado da isoforma constitutiva possa ter um efeito protetor também no remodelamento das vias aéreas. Por outro lado, o bloqueio da enzima induzida se associou à melhora das alterações da matriz extracelular desencadeadas pelo processo inflamatório crônico (Prado et al., 2006).

#### **1.1.4. ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO**

O óxido nítrico possui um elétron ímpar, tornando-o um radical livre que reage com outras moléculas como o oxigênio ( $O_2$ ), radicais superóxido ( $O_2^-$ ) ou metais de transição, formando os compostos reativos nitrogenados, que exercem funções fisiológicas e atuam na destruição de microorganismos (Ricciardolo et al., 2003).

Os radicais livres de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila) podem ser formados após ativação de várias células inflamatórias, por exemplo, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos. Quando as células das vias aéreas e os tecidos são expostos 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; Wood et al., 2003).

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 ( $\text{ONOO}^-$ ) (Pryor e Squadrito, 1995) (Figura 1).

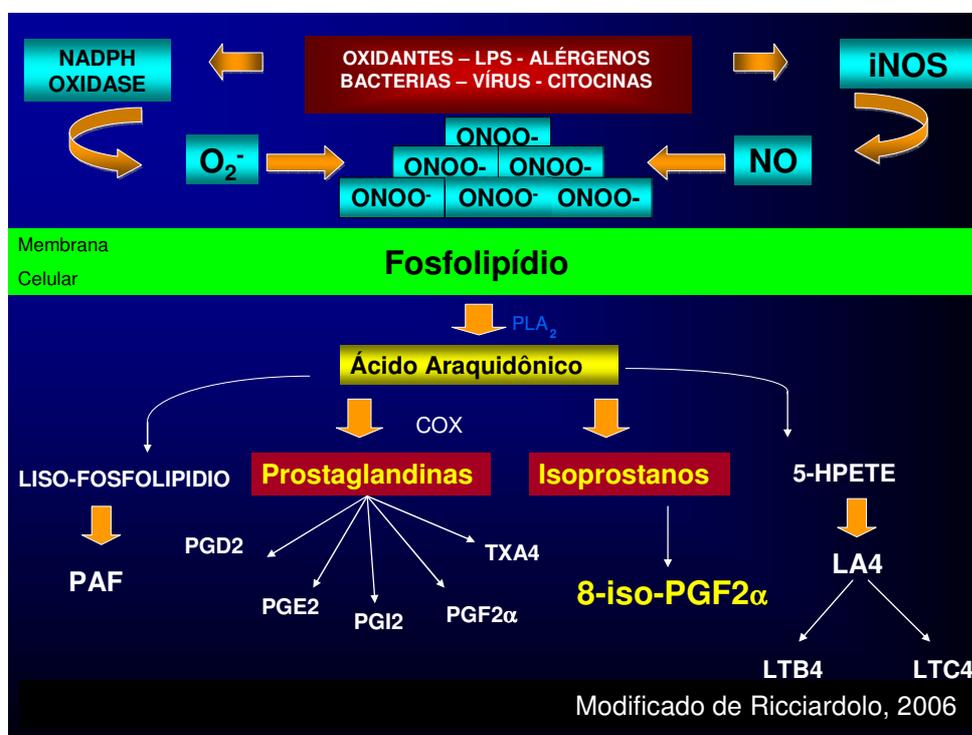
O peroxidonitrito é uma molécula altamente citotóxica e que reage com espécies oxidantes, além de induzir hiperresponsividade nas vias aéreas em cobaias, inibir a produção do surfactante pulmonar, induzir a peroxidação lipídica, aumentar a permeabilidade vascular e causar danos às células epiteliais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

Além disso, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem causar danos no ácido desoxirribonucléico (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; Sedwick et al., 1990).

O contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva a peroxidação da membrana celular lipídica, que é responsável pela geração de uma série recentemente descoberta de compostos bioativos, análogos as prostaglandinas, conhecidas como isoprostanos (Morrow et al., 1990) (Figura 1).

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 ciclooxygenase (COX), onde os isômeros F2-isoprostano se destacam por terem sido a primeira classe de isoprostanos descoberta (Milne et al., 2008).



**Figura 1.** Esquema de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por meio de mediadores inflamatórios com conseqüente formação de isoprostanos. Sob estímulo apropriado, células inflamatórias podem gerar superóxido ( $O_2^-$ ) via ativação da NADPHoxidase ou via NO em altas concentrações (proveniente do aumento da expressão de iNOS). NO reage com o superóxido, formando peroxidonitrito ( $ONOO^-$ ), um potente agente oxidante, que em contato com a membrana celular, leva à peroxidação da membrana lipídica e formação de isoprostanos.

As classes diferem em relação aos grupos funcionais nos anéis prostanos, podendo sofrer isomerização e gerar anéis E e D de isoprostanos, os quais são isômeros às prostaglandinas E2 (PGE2) e prostaglandinas D2 (PGD2), respectivamente (Famm e Morrow, 2003). Os

isoprostanos E2/D2 são formados competitivamente com F2-isoprostano e estudos têm demonstrado que o 15-E<sub>2t</sub>-isoprostano, cujo anel E é análogo ao 15-F<sub>2t</sub>-isoprostano (8-iso-PGF-2 $\alpha$ ), tem propriedades muito similares ao mesmo e é um ligante para os receptores tromboxane (Morrow, 2006). Além disso, tem sido notado que 15-E<sub>2t</sub>-isoprostano é também um ligante para vários receptores PGE<sub>2</sub> (PE). Os isoprostanos E2/D2 não são produtos terminais da via dos isoprostanos (Milne et al., 2008).

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

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

Em humanos, F2-isoprostanos são detectáveis em todos os tecidos e fluidos biológicos analisados, incluindo plasma, urina, lavado broncoalveolar, fluido cérebro-espinhal e bile, tanto quanto em vários outros tecidos (Milne et al., 2008).

No pulmão, podemos detectar isoprostanos em células epiteliais, em macrófagos, no colágeno ao redor das vias aéreas e vasos e também no músculo liso de vias aéreas e vasos (Talati et al., 2005).

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

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-epi-PGF $2\alpha$  no condensado de ar exalado (Montuschi et al., 1999).

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 et al., 2000). Particularmente, as células inflamatórias das vias aéreas como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos liberam quantidades aumentadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) em pacientes asmáticos (Calhoun et al., 1992; Sedwick et al., 1990). O aumento das ROS pode resultar em dano oxidativo direto da célula epitelial e perda celular (Hulsmann et al., 1994), 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  $\beta$ -adrenérgicos sensíveis aos oxidantes e pela diminuição do *clearance* mucociliar.

Desta forma, aspectos do sistema de defesa anti-oxidante, assim como a peroxidação lipídica, são frequentemente utilizados como marcadores indiretos de estresse oxidativo na asma, uma vez que a peroxidação lipídica é de particular significância nesta doença.

Estudos têm demonstrado elevada peroxidação lipídica na asma, mensurada pelo 8-epi-PGF $2\alpha$ , sendo que a sua concentração está aumentada em 3-4 vezes em asmáticos persistentes quando comparados aos indivíduos saudáveis (Wood et al., 2000). O aumento 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).

## **1.2. ASMA BRÔNQUICA**

### **1.2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

O termo *ASMA* tem origem no vocábulo grego “*ASTHMA*” e pode ser traduzida como “ofegante”, “sufocante”. Dos escritos de Hipócrates (460-370 a.C.) aos conhecimentos atuais sustentados pelo progresso da ciência ocorrido principalmente nas duas últimas décadas, houve grandes avanços no esclarecimento da patogênese e terapêutica da asma. Porém, estudos revelam que, apesar dos avanços, a morbidade e a mortalidade por asma ainda são significativas (GINA, 2006; Lugogo e Kraft, 2006). A asma é um problema de saúde mundial que acomete pessoas de todas as idades, principalmente crianças, que são afetadas por essa doença pulmonar crônica que pode levar a limitações significativas na qualidade de vida e na mortalidade, sendo responsável por uma a cada 250 mortes no mundo (GINA 2006).

Sua prevalência vem aumentando, variando de 1% a 18% da população geral em diferentes continentes, com variações conforme a região e o país. Estima-se que 300 milhões de indivíduos sofrem de asma no mundo (GINA, 2006). Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revisados em 2006, 100 a 150 milhões de pessoas têm diagnóstico de asma brônquica e 180.000 pessoas morrem por ano desta doença no mundo.

Além disso, acredita-se que haverá um aumento de 100 milhões de pessoas com asma até o ano de 2025 em função das mudanças de estilo de vida e do aumento da população urbana (45 a 59% até 2025). A prevalência de asma na América do Sul, geralmente está acima da média em relação aos países de todo mundo (GINA, 2006). Dados da OMS (Organização Mundial de Saúde), revisados em 2000, mostram que nos países em desenvolvimento como o Brasil, Costa Rica, Panamá, Peru e Uruguai, 20 a 30% das crianças apresentam sintomas característicos da asma brônquica.

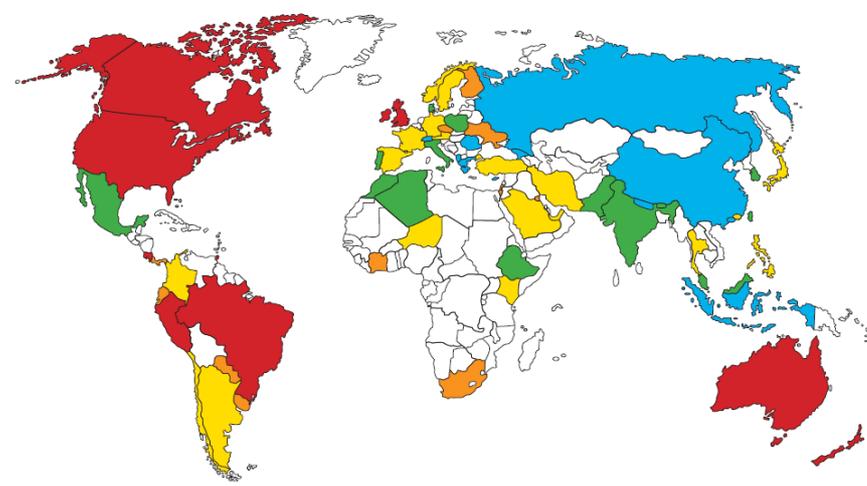
No Brasil, embora a mortalidade parece estar estabilizada (Rio et al., 2002, Hunt et al., 1993), as crises asmáticas ainda foram responsáveis por 6,5% das mortes que ocorreram por doenças respiratórias, apresentando uma maior incidência de óbitos em adultos jovens.

Considerando os dados catalogados pelo DATASUS (Base de Dados do Sistema Único de Saúde), em 2007, as crises asmáticas foram responsáveis por 779 óbitos, sendo que destes 180 ocorreram no Estado de São Paulo. Além disso, aproximadamente 280.000 casos de internações por asma foram registrados no Brasil entre Janeiro e Dezembro de 2007. É interessante notar que, das internações registradas pelo SUS, mais de 50% ocorreram em crianças em idade escolar, sendo os outros 40% registrados em indivíduos de 15 a 50 anos, faixa etária economicamente ativa. Cabe ressaltar que, em média, uma criança com asma falta 3 vezes mais à escola do que uma criança sem este diagnóstico. Além disso, as crises de asma

são responsáveis pela perda de 3 milhões de dias de trabalho por ano nos Estados Unidos (Fowler et al., 1992; Amorim e Daneluzzi, 2001).

No ano de 2007, foi registrado pelo SUS um gasto de R\$ 98.542.045,79, em nível nacional, com internações e medicações para asma. Além disso, como a incidência é alta, particularmente em faixas etárias economicamente ativas, o impacto sócio-econômico é grande em todas as comunidades ao redor do mundo. Por estes motivos, a asma brônquica é considerada atualmente um problema de saúde pública que gera alto custo com medicações e internações de pacientes.

## MAPA MUNDIAL DE PREVALÊNCIA DE ASMA



Proporção de População (%) \*



Scotland	18.4	Ivory Coast	7.8	Oman	4.5
Jersey	17.6	Colombia	7.4	Pakistan	4.3
Guernsey	17.5	Turkey	7.4	Tunisia	4.3
Wales	16.8	Lebanon	7.2	Cape Verde	4.2
Isle of Man	16.7	Kenya	7.0	Latvia	4.2
England	15.3	Germany	6.9	Poland	4.1
New Zealand	15.1	France	6.8	Algeria	3.9
Australia	14.7	Norway	6.8	South Korea	3.9
Republic of Ireland	14.6	Japan	6.7	Bangladesh	3.8
Canada	14.1	Sweden	6.5	Morocco	3.8
Peru	13.0	Thailand	6.5	Occupied Territory of Palestine	3.6
Trinidad & Tobago	12.6	Hong Kong	6.2	Mexico	3.3
Costa Rica	11.9	Philippines	6.2	Ethiopia	3.1
Brazil	11.4	United Arab Emirates	6.2	Denmark	3.0
United States of America	10.9	Belgium	6.0	India	3.0
Fiji	10.5	Austria	5.8	Taiwan	2.6
Paraguay	9.7	Spain	5.7	Cyprus	2.4
Uruguay	9.5	Saudi Arabia	5.6	Switzerland	2.3
Israel	9.0	Argentina	5.5	Russia	2.2
Barbados	8.9	Iran	5.5	China	2.1
Panama	8.8	Estonia	5.4	Greece	1.9
Kuwait	8.5	Nigeria	5.4	Georgia	1.8
Ukraine	8.3	Chile	5.1	Nepal	1.5
Ecuador	8.2	Singapore	4.9	Romania	1.5
South Africa	8.1	Malaysia	4.8	Albania	1.3
Czech Republic	8.0	Portugal	4.8	Indonesia	1.1
Finland	8.0	Uzbekistan	4.6	Macau	0.7
Malta	8.0	FYR Macedonia	4.5		
		Italy	4.5		

**Figura 2.** Mapa mundial de prevalência na asma. Observe que o Brasil encontra-se entre os 15 países de maior prevalência de asma no mundo.

FONTE: GINA 2006

### **1.2.2. DEFINIÇÃO**

A definição mais recente da asma é de 2007, realizada pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA):

*“A asma é uma desordem crônica inflamatória de vias aéreas onde diversas células e elementos celulares desempenham um papel. A inflamação crônica está associada à hiperresponsividade das vias aéreas que tem como consequência, episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e início da manhã. Esses episódios estão normalmente associados à obstrução variável ao fluxo que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento”.*

### **1.2.3. FATORES DE RISCO**

A asma é uma doença multifatorial. Há fatores que podem gerar o desenvolvimento da inflamação presente na asma, os que desencadeiam os sintomas e os que estão relacionados às duas situações. O primeiro caso inclui fatores predisponentes (principalmente genéticos) e no segundo caso, existe uma estreita relação com fatores ambientais, entre eles, alérgenos, drogas, poluentes atmosféricos, alterações ambientais e meteorológicas, infecções, estímulos ocupacionais, irritantes químicos, exercício, aditivos em alimentos e o estresse, como desencadeadores da crise asmática (Cabral *et al.*, 1999; Von Mutius, 2000; GINA, 2006). Entretanto, os mecanismos que

influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma são extremamente complexos e interativos.

A predisposição genética tem sido enfatizada como fator principal para o desenvolvimento da resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) a alérgenos inalatórios comuns, visto que várias pessoas são expostas a substâncias semelhantes e nem todas desenvolvem a asma brônquica, ou ainda, que tempos diferentes de exposição ao antígeno são necessários para que ocorra o desencadeamento da doença; (NIH, 1997; Grasemann *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; GINA, 2006).

Acredita-se que a asma brônquica alérgica é uma doença geneticamente determinada. Os cromossomos 5q, 11q, 12q e 13q contêm vários genes responsáveis pelo desenvolvimento de atopia e asma. Mutações genéticas no cromossomo 5q parecem ser importantes para o desenvolvimento de inflamação na asma e a atopia, incluindo genes para as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13 and GSF. É importante lembrar que IL-4 é uma das principais citocinas responsável pela diferenciação linfocitária Th2 e pelo estímulo à produção de IgE (Martinez e Helms, 1998, Conn *et al.*, 2003). Summerhill *et al.* (2000) avaliaram em 361 indivíduos os polimorfismos no locus 5q para o gene do receptor beta 2 adrenérgico. No entanto, não observaram a associação entre a hiperresponsividade a metacolina e os níveis séricos de IgE com os polimorfismos estudados.

O gene FCER2 presente no cromossomo 19p13 codifica o receptor de baixa afinidade para IgE, sendo considerado um dos marcadores genéticos para as doenças associadas à produção de IgE. Laitinen et al. (2000) avaliaram três marcadores fenotípicos: diagnóstico de asma, IgE total e IgE específica para antígenos inalatórios em 124 famílias da Finlândia e da Catalônia e determinaram a presença de oito polimorfismos em uma região próxima a do gene FCR2. Os autores observaram que, nas famílias nas quais havia a presença de 2 ou mais indivíduos com os fenótipos avaliados, o cromossomo 9p13 poderia ser considerado como um dos determinantes da resposta de IgE.

Dizier et al. (2000) conduziram uma pesquisa de mapeamento genético em 107 famílias francesas que apresentavam pelo menos dois membros com asma. Este estudo fazia parte do EGEA (*“Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness and Atopy”*). Foram detectadas as seguintes associações: 11p13 para IgE, 12q24 para eosinófilos, 17q12-21 para asma e os testes cutâneos e 9q13 para hiperresponsividade.

A atopia e a hiperresponsividade são também importantes fatores para o desenvolvimento da asma, sendo que não precisam, necessariamente, estarem presentes em todos os pacientes asmáticos. Neste aspecto, McFadden e Gilbert (1992) mostraram que mesmo não sendo atópicos e estando assintomáticos, pode-se detectar processo inflamatório ao redor das vias aéreas nestes pacientes.

Em contato com alérgenos comuns, indivíduos atópicos são capazes de desencadear uma produção de grande quantidade de anticorpos tipo IgE específicos, que podem ser detectados no soro ou por meio de testes cutâneos para uma série de alérgenos (GINA, 2006; Pearce et al., 1999).

**Quadro 1.** Fatores que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma  
(Fonte: modificado do GINA, 2006)

<b>FATORES INDIVIDUAIS</b>
Genéticos: pré-disposição a atopia e a hiperresponsividade Sexo Obesidade Raça/Etnia
<b>FATORES AMBIENTAIS</b>
<b>ALÉRGENOS:</b> - Domésticos: Ácaros, animais(cães, gatos, ratos), barata, fungos, mofo, hifas - Externos: Pólen, fungos, mofo, hifas <b>AGENTES OCUPACIONAIS</b> - Tabaco: Fumantes ativos e/ou passivos - Poluentes: Domésticos e ambientais - Infecções Respiratórias - Fatores Sócio-econômicos - Número de Familiares na casa - Dieta - Drogas Obesidade
<b>FATORES QUE PRECIPITAM A EXACERBAÇÃO DA ASMA E/OU CAUSA PERSISTÊNCIA DOS SINTOMAS</b>
Alérgenos domésticos e externos Poluentes domésticos e externos Infecções respiratórias Exercício e hiperventilação Mudanças climáticas Dióxido de enxofre Comidas, aditivos, drogas Condição emocional Fumaça de cigarro Irritantes inalatórios como <i>sprays</i> domésticos, tintas e outros

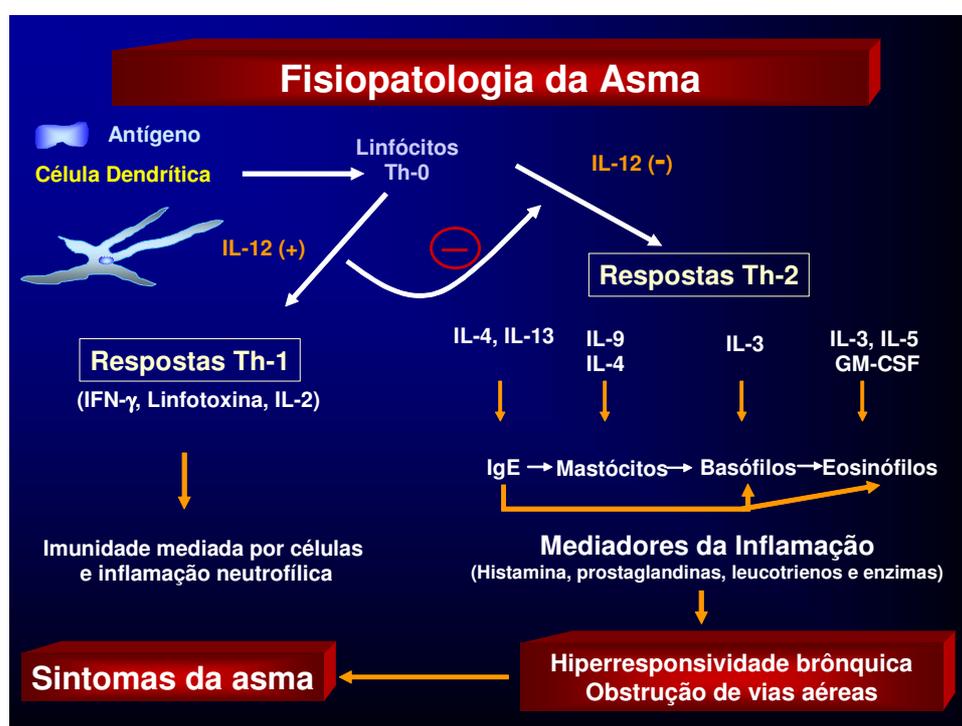
#### **1.2.4. FISIOPATOLOGIA**

A asma é uma desordem inflamatória das vias aéreas que envolve várias células inflamatórias e múltiplos mediadores que resultam em diferentes alterações fisiopatológicas (GINA, 2006).

O processo inicial para o desenvolvimento desta doença parece ser a sensibilização. Para que este processo ocorra, é necessário que as células apresentadoras de antígeno, como os macrófagos alveolares, as células epiteliais (Nakajima et al., 1997) e, principalmente as células dendríticas, interajam com os linfócitos auxiliares Th e desencadeiem, através dos linfócitos B, a produção de IgE. Estes anticorpos liberados na circulação se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos. Estudos epidemiológicos e observações clínicas apontam uma importante correlação entre os níveis de anticorpos da classe IgE e a gravidade da asma (Burrows et al., 1989; Varner e Lemanske, 2000).

Indivíduos atópicos desenvolvem anticorpos do tipo IgE, específicos àqueles alérgenos, depois de serem expostos a baixas e repetidas doses de antígeno. Após o indivíduo estar sensibilizado, uma exposição subsequente inicia uma resposta humoral secundária. Após ativação e desgranulação de mastócitos está iniciada a resposta asmática imediata, onde estas células, em conjunto com os macrófagos, linfócitos T e células epiteliais, liberam mediadores inflamatórios como a histamina, leucotrienos e prostaglandinas entre outros mediadores, que induzem à constrição aguda da musculatura

lisa das vias aéreas. Os grânulos liberados dos mastócitos podem ainda causar várias alterações como agressão epitelial, anormalidades no controle neural autônomo do tônus da via aérea, hipersecreção de muco e aumento da responsividade do músculo liso das vias aéreas (Bousquet et al., 2000; GINA, 2005). (Figura 3)



**Figura 3.** Mecanismos fisiopatológicos da asma brônquica envolvendo uma série de células inflamatórias e mediadores. As respostas alérgicas são predominantemente de classe Th2 e envolvem, principalmente, as citocinas IL-3, IL4, IL-5, IL-9 e IL-13, entre outros mediadores. Fonte: Modificado do GINA, 2005 . GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia Granulócito – Macrófago; IFN- $\gamma$  – Interferon-Gama.

Esta resposta imediata, que ocorre com um novo contato com o antígeno após o processo de sensibilização, é caracterizada por uma instalação rápida, de poucos minutos e que evidencia edema de mucosa, aumento do tônus do músculo liso com constrição das vias aéreas, associados à desgranulação mastocitária (Pauwels, 1989). Em humanos, o pico desta resposta parece ocorrer em cerca de 10 a 20 minutos e costuma finalizar-se em torno de 1 a 2 horas após a exposição ao antígeno (Wills-Karp, 1999). A contração da musculatura lisa brônquica nesta fase parece ser o principal fator da obstrução da luz das vias aéreas.

A liberação dos mediadores inflamatórios é responsável pela migração de eosinófilos, linfócitos T e neutrófilos para as vias aéreas, caracterizando o início da fase tardia da resposta asmática (Bousquet et al., 1990; Santing et al., 1994; Schuiling et al., 1998). Esta fase pode iniciar-se de três a seis horas após o contato com o antígeno e persistir por horas ou dias, caso não haja tratamento adequado. Normalmente, esta reação costuma resolver-se em torno de 24 horas. É definida em humanos como uma redução de 20% no VEF1 após uma inalação padronizada de agonista broncoconstritor ou de antígeno, que tenha causado uma resposta aguda equivalente a 20% de queda do VEF1 (Durham et al., 1984). Em modelos animais, particularmente em cobaias, parecem existir duas respostas asmáticas tardias, sendo a primeira em torno de 17 horas após o contato com o antígeno, e a segunda normalmente em 72 horas (Hutson et al., 1988; Lanças et al., 2006).

Com o intuito de avaliar se a presença de resposta tardia poderia ser predita a partir das características basais da prova de função pulmonar, Avila et al. (2000) analisaram os resultados deste teste em situação basal e após desafio antigênico, o teste de broncoprovocação com metacolina, assim como o escarro induzido de 60 pacientes asmáticos. A PC20 de metacolina de 0,25mg se associou à presença de resposta tardia: 87% dos pacientes com PC20 abaixo desta dose apresentaram resposta tardia comparativamente a 38% com PC20 acima desta dose. Não houve correlação com os valores basais de VEF1 e a análise do escarro induzido. Os autores concluíram que a avaliação da hiperreatividade à metacolina auxilia na determinação dos pacientes que podem apresentar resposta tardia.

A inflamação contribui para a hiperresponsividade das vias aéreas, desempenhando papel fundamental na limitação ao fluxo aéreo, na contração do músculo liso brônquico, no edema de vias aéreas e no aumento da produção de muco, caracterizando a resposta asmática tardia. O desencadeamento de várias respostas tardias pode levar ao remodelamento das vias aéreas e contribuir para que não ocorra reversibilidade na obstrução ao fluxo de ar em vias aéreas (Tiddens et al., 2000).

### **1.3. REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR: DENSIDADE DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS**

O remodelamento pulmonar é um termo que se refere a um processo dinâmico de reconstrução de estruturas celulares ou dos tecidos. Entretanto, na asma, postula-se que no remodelamento pulmonar ocorram mudanças na composição, no conteúdo e na organização dos constituintes celulares e moleculares do trato respiratório (Shiba et al., 2002). O processo inflamatório crônico pulmonar, característico desta doença, poderia ser a principal causa da reconstrução das suas estruturas de maneira anormal e irreversível (Jeffery, 2004). Essa reconstrução anormal é, portanto, uma tentativa de manter as vias aéreas e o parênquima pulmonar intactos e restringir o processo agressor representado pela resposta inflamatória (Roche et al., 1989; Laitinen et al., 1993; Li e Wilson, 1997).

No processo de remodelamento que ocorre na asma brônquica, diversos eventos podem ser observados, como a hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa das vias aéreas (Ebina et al., 1993), proliferação vascular (Li e Wilson 1997), aumento das glândulas mucosas, espessamento da membrana basal, aumento no número de células claras no epitélio das vias aéreas (Laitinen et al., 1993), alteração da matriz extracelular, tal como aumento na deposição de colágeno (Roche et al., 1989) e fragmentação de fibras elásticas (Mauad et al., 1999), com alterações estruturais no parênquima.

Na parede das vias aéreas tem sido mostrado aumento no espessamento de 50-300% em pacientes que morreram de asma e aproximadamente, aumento de 10-100% em indivíduos com casos leves a moderados. Além disso, há evidências de que o espessamento da parede das vias aéreas, analisado por estudos radiológicos, se correlaciona com a gravidade e extensão da doença (James, 1997; Ebina, 1993).

O remodelamento pulmonar na asma envolve uma série de mecanismos e mediadores que podem ser teoricamente relevantes, embora não sejam ainda completamente compreendidos (Durham,1984; Ferreira, 1998; Mauad, 2004). As células epiteliais das vias aéreas produzem muitos fatores inflamatórios e os danos epiteliais participam do processo pró-inflamatório através da ativação de citocinas, fatores de crescimento e mediadores em pacientes asmáticos, como os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento do fibroblasto básico (b-FGF), dentre outros (Tagaya e Tamaoki, 2007). Estes fatores afetam a proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular, entre os quais, o fator transformador do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) que é produzido pelo epitélio das vias aéreas e pode ser uma das mais importantes moléculas no processo de remodelamento. O TGF- $\beta$  pode ser sintetizado ainda por macrófagos, eosinófilos, linfócitos e fibroblastos, todos aumentados em pacientes asmáticos.

Os fibroblastos são freqüentemente encontrados no tecido conectivo e são responsáveis pela produção de uma variedade de componentes da matriz extra-celular, como o colágeno, fibras reticulares e elásticas, laminina, fibronectina, ácido hialurônico, glicoproteínas da substância extracelular amorfa e proteoglicanos (Sheppard e Harrison 1992; Spoelstra et al., 2001). A membrana basal forma uma barreira entre o meio externo e o epitélio de um lado e o interstício do outro. Isto só é possível pela presença dos componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos (Roche et al., 1989). A alteração no comportamento do fibroblasto parece ser fator imprescindível para que ocorra o remodelamento.

Na asma, além da fibrose subepitelial, ocorre um aumento do número de miofibroblastos, que apresentam um fenótipo intermediário entre fibroblastos e miócitos (células do músculo liso), além de ter a habilidade de secretar proteínas da matriz extracelular e quimiocinas que podem prolongar a sobrevivência de eosinófilos. Recentemente, Batra et al. (2004) demonstraram que a interleucina 4 (IL-4), assim como o TGF- $\beta$ , estimulam fibroblastos a expressar actina- $\alpha$  do músculo liso em lavado broncoalveolar após desafio com alérgeno em humanos, sugerindo uma importância dos miofibroblastos na patogênese da asma. Além de produzirem colágeno, os miofibroblastos ativados podem ainda contribuir com a inflamação, produzindo diferentes tipos de citocinas e quimiocinas (Spoelstra et al., 2001).

Recentemente, tem sido evidenciada uma possível participação do óxido nítrico também na proliferação celular e na deposição de fibras

colágenas. No entanto, seu papel no processo de remodelamento que ocorre na asma brônquica ainda é pouco estudado. Gabazza et al. (2000) demonstraram uma correlação positiva entre as concentrações de nitrito/nitrato no escarro induzido de pacientes asmáticos e o remodelamento brônquico, sugerindo assim que o NO esteja envolvido no processo de remodelamento de vias aéreas. Mais recentemente, demonstrou-se que o óxido nítrico inibe a proliferação das células da musculatura lisa das vias aéreas na fase G1 via GMPc-dependente (Hamad e Knox, 2001).

O mecanismo de deposição de matriz extracelular parece ser um balanço entre sua síntese e sua degradação. A deposição de colágeno no tecido é controlada pelo balanço entre as metaloproteinases de matriz que degradam colágeno (MMPs) e seus inibidores, conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Na asma, os membros mais importantes desta família são a MMP-9 e a TIMP-1. O aumento da expressão de TIMP-1 causa deposição de matriz extracelular e espessamento da membrana basal pela inibição da degradação de matriz extracelular. Estudos em indivíduos asmáticos têm mostrado aumento na produção tanto de MMP-9 quanto de TIMP-1 no muco e no lavado broncoalveolar (Tagaya e Tamaoki, 2007).

A MMP-2 (colagenase A), a MMP-3 (stromelisin), MMP-9 (gelatinase B) e a MMP-12 (metaloelastase) estão aumentadas em asmáticos, embora a MMP-9 pareça ser a principal (Kelly e Jarjour, 2003), estando aumentada no sangue, no fluido do lavado broncoalveolar, no

escarro e em biópsias de asmáticos, inclusive até 24 horas após o desafio antigênico (Atkinson e Sênior, 2003).

No pulmão a MMP-9 pode ser produzida por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e células dendríticas, entre outras (Ohno et al., 1997; Kelly et al., 2000; Atkinson e Sênior, 2003; Ohbayashi e Shimokata, 2005). A MMP-9 pode ativar mecanismos de reparo inadequados como a ativação da produção de TGF- $\beta_1$  (fator transformador do crescimento beta) aumentando a síntese de colágenos pelos fibroblastos que, por sua vez, estimula os processos fibróticos (Lee et al., 2001).

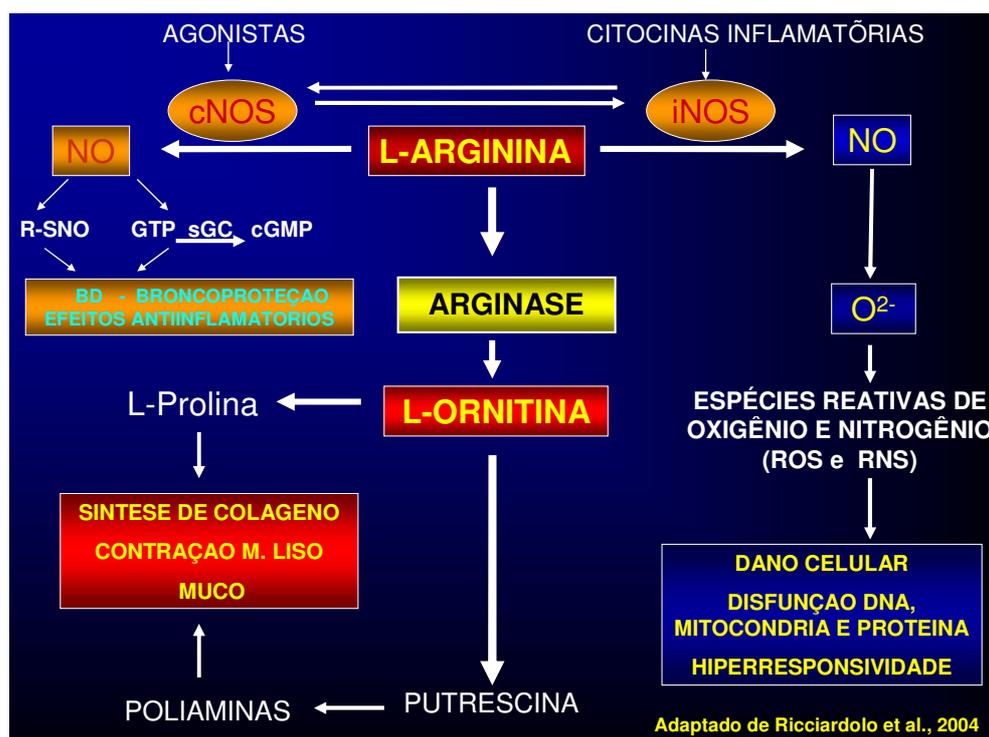
Alguns autores sugerem que a degradação dos componentes da matriz extracelular pelas MMPs e outras proteinases, ocorra na fase imediata da asma e a produção aumentada de TIMP-1 possa ocorrer na fase tardia deste processo (Chiappara et al., 2001; Vignola et al., 2003a).

Neste sentido, Lanças et al. (2006) observaram remodelamento no tecido pulmonar periférico, caracterizado pelo aumento do conteúdo de colágeno em fatias de tecido pulmonar periférico de cobaias sensibilizadas, provavelmente, secundários à inflamação crônica. O conteúdo de colágeno apresentou correlação positiva com as medidas de resistência e elastância nos animais com resposta inflamatória tardia, sugerindo que o remodelamento das vias aéreas e do tecido pulmonar periférico pode contribuir significativamente com a perda de função pulmonar nos pacientes asmáticos.

Outro importante componente no remodelamento é a elastase, que em concentrações aumentadas degrada as fibras do sistema elástico, sendo os neutrófilos sua principal fonte. Cabe ressaltar que também os macrófagos e eosinófilos produzem elastase (Vignola et al., 1998b; Vignola et al., 2001; Vignola et al., 2003b). Confirmando estes achados, Vignola et al. (2003b) demonstraram porcentagem aumentada de elastase, de neutrófilos e eosinófilos no escarro induzido de pacientes asmáticos, comparados com indivíduos controle.

Além disso, Mauad et al. (1999) demonstraram que ocorre diminuição do conteúdo de fibras elásticas nas vias aéreas de pacientes asmáticos, sugerindo que este sistema tem importância crucial no processo de remodelamento brônquico. Sabe-se ainda que diversos mediadores inflamatórios participam do processo de fibrogênese, perpetuando a agressão tecidual e a formação de tecido cicatricial (Boulet, 1997).

Alguns autores têm discutido ainda, que a arginase pode atuar em miofibroblastos aumentando a produção de colágeno, via produção de L-ornitina (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). Alguns autores sugerem que a arginase possa estimular estas células a produzirem maior quantidade de colágeno, contribuindo assim com o processo de remodelamento (Ricciardolo et al., 2003; Meurs et al., 2003). Estes efeitos ocorrem via produção de L-ornitina e L-prolina que são produtos da arginase (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema simplificado de formação e metabolismo da arginase e de espécies reativas de oxigênio via iNOS. As óxido-nítrico sintases (NOS) convertem a L-arginina em dois tipos de óxido nítrico (NO): o proveniente das NOS constitutivas (cNOS) e o proveniente das NOS induzidas (iNOS). Por outro lado, a L-arginina é metabolizada pela arginase que a converte em L-ornitina e é precursora das poliaminas e da L-prolina, as quais contribuem com o processo de remodelamento pulmonar.

Estudos em pacientes asmáticos demonstraram redução dos níveis de arginina no plasma associado a um aumento da atividade da arginase sérica (Morris, 2004). Como consequência deste aumento, há maior produção de L-ornitina (Wu et al., 1998; Zimmermann e Rothenberg, 2006) levando a um aumento na síntese e na secreção das colagenases (Prosser, 1988), fato relevante também no processo de remodelamento pulmonar.

#### **1.4. O PAPEL DO PARÊNQUIMA PULMONAR NA FISIOPATOGENIA DA ASMA**

Devido ao desenvolvimento de novas tecnologias foi possível demonstrar que a porção distal do pulmão contribui para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (Yanai et al., 1992; Wagner et al., 1998). Considerava-se que esta região, antes conhecida como “zona silenciosa”, contribuiria somente com 10% do valor total de resistência ao fluxo aéreo pulmonar. Além disso, as novas tecnologias permitiram demonstrar que há alterações estruturais e inflamatórias no parênquima distal, similares às observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Minshal et al., 1998; De Magalhães et al., 2005; 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 a resposta ao tratamento da doença (Tulic e Hamid, 2003).

Desta forma, tem sido proposto que o pulmão periférico, considerado como as vias aéreas de calibre  $\leq 2\text{mm}$  de diâmetro e o parênquima pulmonar adjacente, pode ter um papel fundamental na resistência pulmonar total (Bachofen, 1968), alertando para a possibilidade da participação também do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que provavelmente altera o conceito e principalmente as formas de pensar o

tratamento da doença (Ludwig e Dallaire, 1994). Além disto, estes fatos alertam para a possibilidade de sub-tratamento da doença, uma vez que os esteróides inalatórios mais usados atualmente, apresentam sua deposição principalmente nas vias aéreas centrais e não na periferia pulmonar (Tulic e Hamid, 2003). Desta forma, um dos desafios terapêuticos da asma tem sido desenvolver novas tecnologias inalatórias que permitam uma melhor oferta de agentes inflamatórios à porção distal do pulmão.

Carrol et al. (1997) demonstraram que o aumento no número de linfócitos e eosinófilos era uniformemente distribuído ao longo das vias aéreas proximais e distais em pacientes com asma grave e moderada, comparativamente aos indivíduos controle. Neste sentido, alguns autores já demonstraram aumento no número de células T (CD<sub>3</sub>), eosinófilos total, eosinófilos ativados, assim como aumento na expressão de mRNA positivo para IL-5 e IL-4 nas vias aéreas distais de pulmões ressecados de indivíduos asmáticos comparativamente aos indivíduos normais (Hamid, 1997, Minshall et al., 1998). Kraft et al. (1996) também mostraram inflamação alveolar em pacientes com asma noturna, o que não ocorre nos indivíduos que apresentam asma não noturna.

Neste sentido, Haley et al. (1998) avaliaram a distribuição de células CD45+ dentro de regiões subepiteliais da parede de vias aéreas e mostraram que, nas vias aéreas distais de indivíduos asmáticos, a maioria das células leucócitos e eosinófilos CD45+ está na região externa à parede da via aérea (definida como a área entre o músculo liso e o alvéolo).

É interessante notar que nas grandes vias aéreas dos mesmos indivíduos a maior densidade destas células se encontra no interior da parede da via aérea (definida como área entre a membrana basal e o músculo liso). A diferente organização das células inflamatórias através da árvore traqueo-brônquica pode ser atribuída às diferenças nos mecanismos de recrutamento de células inflamatórias e/ou às diferenças na produção de citocinas e quimiocinas entre estas regiões, além de diferenças na inervação (Tulic e Hamid, 2003).

Vale ressaltar, que os indivíduos asmáticos com espirometria normal podem apresentar um aumento da resistência das vias aéreas distais em até sete vezes quando comparados aos indivíduos normais (Wagner et al., 1990).

Em modelos experimentais de inflamação alérgica crônica pulmonar em cobaias, Lanças et al. (2006) observaram aumento no número de eosinófilos e na responsividade do tecido pulmonar, observada através de curva dose resposta específica (com ovoalbumina) e inespecífica (com metacolina) em sistema de mecânica oscilatória, utilizando fatias de tecido pulmonar periférico.

Considerando o remodelamento pulmonar, Xisto et al. (2005) demonstraram um aumento do conteúdo de colágeno e de actina em fatias de tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em ratos. Estas alterações apresentaram uma correlação positiva

com o aumento da resistência e elâstancia, evidenciando que a inflamação, as alterações mecânicas, assim como o remodelamento, não ocorrem apenas nas vias aéreas, mas também no parênquima pulmonar.

## **1.5. AVALIAÇÃO DE MECÂNICA OSCILATÓRIA DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO**

Vários autores têm utilizado fatias de tecido pulmonar periférico para avaliação do papel do parênquima na inflamação pulmonar obstrutiva crônica (Dolhnikoff et al., 1999; Xisto et al., 2005; Lanças et al., 2006; Angeli et al., 2008).

Demonstramos recentemente que o tratamento crônico com L-NAME interfere na resposta de resistência e elastância do tecido pulmonar periférico em cobaias com inflamação crônica de vias aéreas, sugerindo que o NO, e provavelmente a arginase, estão envolvidos nas alterações de parênquima pulmonar presentes na asma (Angeli et al., 2008).

Assim, fatias de tecido pulmonar (“*strips*”) analisadas através de mecânica oscilatória, têm sido usadas como instrumento capaz de elucidar as propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão. Neste sentido, Salerno et al. realizaram vários estudos utilizando esta técnica e demonstraram que o fragmento pulmonar periférico seria um modelo ideal para o estudo das propriedades reais da mecânica pulmonar, uma vez que

as vias mais proximais podem sofrer maior influência da parede brônquica na determinação da resposta mecânica (1995; 1998; 2004).

## **1.6. JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO**

Apesar da participação do NO na modulação da resposta inflamatória ter sido intensamente investigada nos últimos dez anos, resultados bastante controversos ainda são encontrados na literatura, sugerindo que o NO tenha uma dupla função na patogênese da asma. Para permitir estudos mais aprofundados sobre a real participação de cada isoforma da NOS em diferentes aspectos fisiopatológicos, uma gama de inibidores da produção de NO tem sido desenvolvidos, sendo cada vez mais aprimorados em sua seletividade e especificidade.

A produção de óxido nítrico pode ser inibida pelo bloqueio da enzima óxido nítrico sintase (Moncada e Higgs, 1993) ou ainda pela administração de falso substrato que faz com que esta enzima deixe de produzir o óxido nítrico. Já há algum tempo, existe uma série de inibidores de óxido nítrico, que são utilizados em laboratórios, para bloquear a ação destas enzimas, sendo que a maioria deles encontra-se disponível comercialmente. Alguns exemplos destes inibidores são a N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide (1400W), L-NG-monometil-arginina (L-NMMA), a L-NG-nitroarginina metil ester (L-NAME), NG-nitro-L-arginina (L-NOARG), NG-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), L-NG-nitroarginina-p-nitroanilida (L-NAPNA), L-canavanina, hidroxicobalamina e aminoguanidina (Rees et al., 1989).

Embora durante muitos anos a aminoguanidina tenha sido considerada um inibidor específico de iNOS (Baddedge et al., 1993) recentemente sua especificidade no bloqueio desta isoforma é questionada (Birrell et al., 2003). Há alguns anos, Garvey et al. (1997) demonstraram que o 1400W apresenta alta seletividade na inibição de iNOS tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentando efeitos tóxicos somente em altíssimas doses (25 mg/Kg). Desta forma, o 1400W passou a ser a ferramenta mais utilizada nos dois últimos anos para o estudo da participação do óxido nítrico produzido via iNOS em diversos processos fisiopatológicos, inclusive na asma brônquica.

Como a L-arginina é o substrato comum tanto para NOS quanto para a arginase, o bloqueio de uma destas vias enzimáticas pode modular indiretamente a atividade da outra (Meurs et al., 2002; Ricciardolo et al., 2004). A inibição crônica e inespecífica da produção de NO, por meio do L-NAME, resulta em intensa broncoconstrição basal após estímulo antigênico, particularmente em vias aéreas proximais, além de reduzir o número de células mononucleares, a formação de edema peribrônquico e de aumentar a deposição de fibras colágenas na parede das vias aéreas distais (Prado et al., 2005b). Por outro lado, a inibição específica e seletiva de iNOS, por meio do 1400W, reduz a broncoconstrição, a inflamação e o processo de remodelamento brônquico em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias.

Desta forma, estes resultados observados por nosso grupo de pesquisa, relacionados ao tratamento crônico com L-NAME neste modelo experimental, podem ser atribuídos tanto à deficiência da produção de NO, quanto à estimulação da atividade da arginase devido a uma maior disponibilidade de substrato (Que et al., 1998; Boucher et al., 1999).

Consideramos também que o estudo de inibidores da iNOS nas alterações de parênquima pulmonar possa ter fundamental relevância, visto que alguns autores sugerem a utilização destas drogas como futuras estratégias terapêuticas, podendo indicar um futuro promissor para o tratamento de diversas doenças, dentre elas a asma. Além disso, o estudo do papel da inibição da iNOS pode contribuir para a melhor compreensão dos efeitos da disfunção do complexo arginase-NOS na fisiopatologia da asma, particularmente no remodelamento pulmonar.

Cabe ressaltar por fim que ainda que não foram encontrados estudos que avaliassem os efeitos de inibidores de iNOS no parênquima pulmonar, no qual fossem analisados não somente seus efeitos no controle da hiperresponsividade e na resposta inflamatória, mas também seu papel no remodelamento do parênquima.

## **2. OBJETIVOS**

Deste modo, nossos objetivos neste projeto foram:

1. Avaliar os efeitos da inibição específica da iNOS em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias, caracterizando o impacto nos seguintes aspectos:
  - a- Na mecânica do tecido pulmonar periférico.
  - b- Na inflamação eosinofílica no septo alveolar.
  - c- No remodelamento da matriz extracelular no parênquima pulmonar, particularmente.
  - d- Na atuação da via do estresse oxidativo, por meio da avaliação da expressão de isoprostano-8.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na sessão de 29 de junho de 2006 sob o número 534/06 - CAPPesq.

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)*, sendo que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob efeito de anestesia geral.

#### **3.1. ANIMAIS**

Foram utilizadas cobaias do sexo masculino, de linhagem *Hartley*, provenientes da empresa *MEDLAB Produtos Diagnósticos LTDA, São Paulo, Brasil*. Os animais foram mantidos durante todo o período do experimento, no biotério de manutenção em conjunto com os Laboratórios de Investigação Médica (LIM) 20 e 05, desta Faculdade, recebendo alimento e água *ad libitum*, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído. Os animais foram retirados do biotério somente para realização das etapas do protocolo.

O peso médio dos animais no início do protocolo de tratamento com 1400W era de 300 a 350g e idade de aproximadamente três semanas no início do processo de sensibilização inalatória. Para este experimento, foi utilizado um total de 53 animais. Não houve perda de animais durante o protocolo de tratamento com 1400W e inalações, sendo perdidos apenas 5 animais nos procedimentos de realização da mecânica pulmonar e 4 animais apresentaram lesões pulmonares, sendo excluídos do protocolo.

### **3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram estudados quatro grupos experimentais, sendo que os animais receberam, respectivamente:

- a) Inalações com soro fisiológico 0,9% estéril e soro fisiológico 0,9% estéril i.p. (grupo SF, n=10);
- b) Inalações com solução de ovoalbumina e soro fisiológico estéril 0,9% i.p. (grupo OVA, n=10);
- c) Inalações com soro fisiológico estéril 0,9% e 1400W i.p. (grupo SF-W, n=12);
- d) Inalações com solução de ovoalbumina e 1400W i.p. (grupo OVA-W, n=12);

No dia da última inalação teve início o protocolo de tratamento com 1400W e após quatro dias, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica oscilatória do tecido pulmonar.

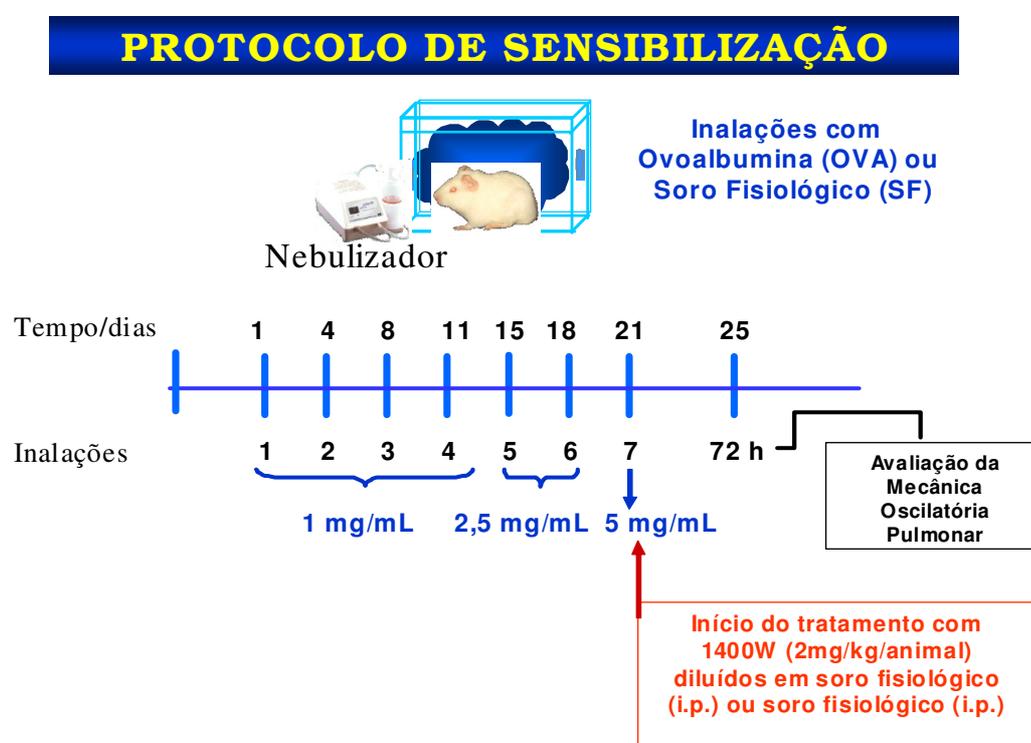
### **3.3. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO**

Os animais foram colocados, um a um, em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (*Soniclear, São Paulo, Brasil*), capaz de gerar partículas com diâmetro variável de 0,5 a 10 $\mu$ m, com taxa de nebulização de 1ml/min (Figura 5).

Foram então submetidos à inalação com aerossol de ovoalbumina (Grupo OVA) (*Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA*) diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico - SF) (*Baxter, São Paulo, Brasil*) ou à inalação com soro fisiológico apenas (Grupo controle- SF) por um período máximo de 15 minutos ou até o surgimento de sinais de desconforto respiratório, quando a inalação era interrompida e os animais retirados da caixa para recebimento de suporte de oxigênio, caso necessário. Tiragem intercostal, tosse, coriza e/ou cianose intensas foram os sinais de desconforto considerados.

O tempo em que os animais permaneceram em contato com o aerossol foi cronometrado e denominado tempo de inalação (TI). Os animais foram submetidos à inalação duas vezes por semana, num total de sete

inalações. As concentrações de antígeno foram crescentes (1~5 mg/mL-1), com o intuito de evitar-se a indução de tolerância (Paré et al., 1979; Sedgwick e Holt, 1985). Nas quatro primeiras inalações a dose utilizada foi de 1 mg/mL, na quinta e na sexta inalações utilizou-se uma concentração de 2,5 mg/ml e na última (7<sup>a</sup>) inalação, a concentração de antígeno utilizada foi de 5mg/ml (Figura 5).



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

### **3.4. TRATAMENTO COM 1400W – INIBIDOR ESPECÍFICO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO INDUZIDA - INOS**

Trinta minutos antes da sétima inalação, ou seja, 72 horas antes do protocolo de Avaliação da Mecânica Pulmonar, teve início o tratamento com N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamidine (1400W) (*Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido*) nos animais dos grupos OVA-W e SF-W. O tratamento foi administrado diariamente por quatro dias, na dose de 2mg/Kg/dia/animal por via intraperitoneal, como previamente descrito (Prado et al., 2006). Animais controle receberam veículo (SF) de 1400W, em volume correspondente.

### **3.5. PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE MECÂNICA OSCILATÓRIA DE TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO**

Setenta e duas horas após a sétima inalação, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/Kg i.p.), traqueostomizados e após toracotomia, exsanguinados. Os pulmões foram infundidos com solução de *Krebs* (em mM: NaCl, 118; KCl, 4.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25.5; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; glicose 10; *Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA*). Foram realizados cortes sagitais de ambos os pulmões (aqui definidos como pulmão total) sendo os mesmos, cobertos com *Optimum Cutting Temperature* (OCT) (*Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanha*) e colocados em

nitrogênio líquido para subsequente detecção da expressão de iNOS, por meio de técnica imunohistoquímica.

Fatias de tecido pulmonar periférico de cobaias, submetidas ao protocolo de sensibilização descrito previamente, foram obtidas da região subpleural medindo aproximadamente 10mm x 2mm x 2mm, tendo seu peso e seu comprimento de repouso ( $L_0$ ) medidos.

Cada uma das pontas do fragmento foi colada com cianocrilato á um pequeno *clip* metálico fixado em um longo fio de aço de 0,5mm de diâmetro e o conjunto foi suspenso verticalmente e mergulhado num banho de 15ml de solução de *Krebs.*, constantemente aerada com 95% de  $O_2$  e 5% de  $CO_2$ , contido em um recipiente de vidro (Figura 6A). De um lado, uma das pontas foi ligada a um transdutor de força (*modelo 400A; Cambridge Technologies, Watertown, MA, EUA*) que opera em torno de 10g, com uma resolução de 200 $\mu$ g e uma complacência de 1 $\mu$ g/g. A outra ponta atravessou um orifício na parte inferior do recipiente, onde foi colocada uma gota de mercúrio, pois sua alta tensão superficial previne a perda ou o extravasamento da solução de *Krebs* contida no recipiente, e foi conectada a um braço oscilatório de controle de alterações de comprimento (L) (*Modelo 300B; Cambridge Technologies, Watertown, MA, EUA*). Este braço, que é capaz de determinar, ponto a ponto, a excursão de 8mm e a resolução de 1  $\mu$ m de comprimento, foi conectado a um gerador (*Modelo 3030; BK Precision, Chicago, IL, EUA*), que controla a freqüência, amplitude e a forma de onda da oscilação.

A tensão (T) é obtida através do movimento do parafuso que efetua pequenos deslocamentos do transdutor de força. Os sinais de comprimento e força são captados e filtrados lentamente (*8-pole Bessel 902LPF; Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA*) com uma frequência de 30Hz e convertidos em leitura analógica à digital por um conversor (*DT2801-A; Data Translation Inc, Marlborough, MA, EUA*) sendo então, gravados num programa de computador (Figura 6B).

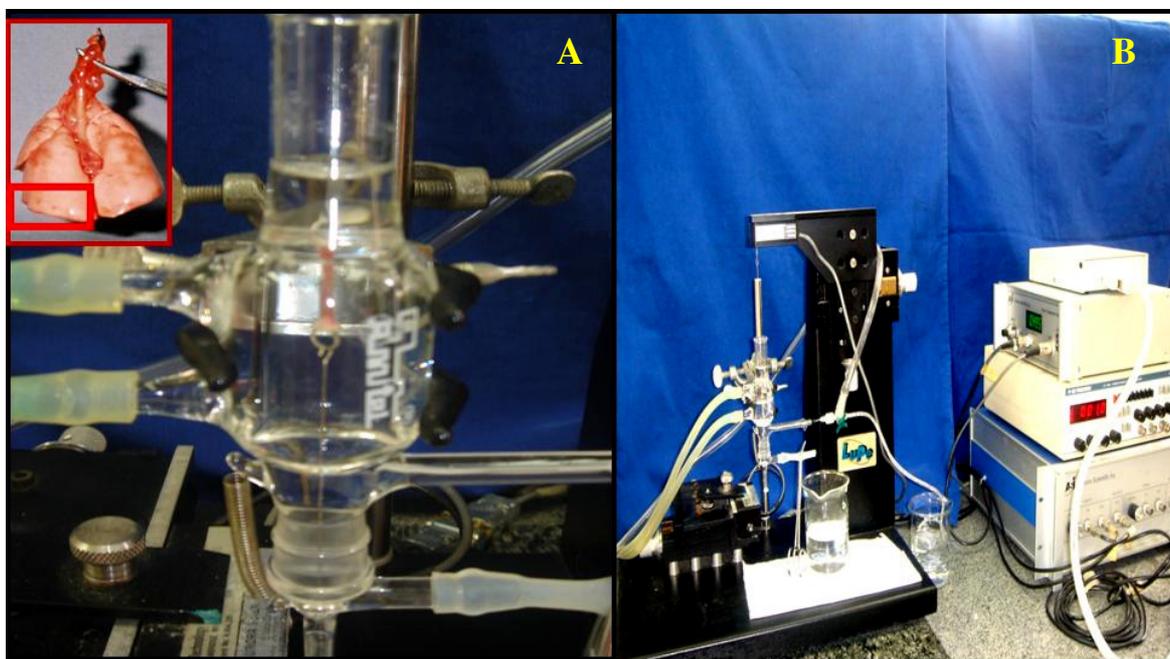
O tecido foi submetido a uma força de 2g por três vezes (“*stress relaxation*”) retornando para uma força de 1 a 2g, com oscilação sinusoidal de 2,5% do comprimento inicial a uma frequência de 1Hz. Após 50 minutos de estabilização (com trocas de *Krebs* a cada 15 minutos), foram obtidos os dados de mecânica do tecido sob condições basais (por 5 minutos) e após desafio com ovoalbumina a 0,1% no banho (por 10 minutos) para obtenção de uma resposta máxima (Nagase, 1995). Os valores de elastância (Et) e resistência (Rt) do tecido foram estimados através da equação de movimento, descritas anteriormente. (Lauzon, 1991):

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

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

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

onde  $p$  é a densidade de massa do tecido adotada como  $1.06 \text{ g/cm}^3$ ,  $W_0$  é o peso úmido em gramas, e  $L_r$  é o comprimento em repouso em centímetros. Os valores de  $R_t$  e  $E_t$  foram multiplicados por  $L_r/A_0$ . Foi analisada a porcentagem de aumento da resistência (% $R_t$ ) e elastância (% $E_t$ ), em relação à condição basal (pré-desafio com OVA). Após a oscilação mecânica, as fatias de tecido pulmonar periférico foram fixadas em formol 10% por 48 h e embebidos em parafina para análise histológica.



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

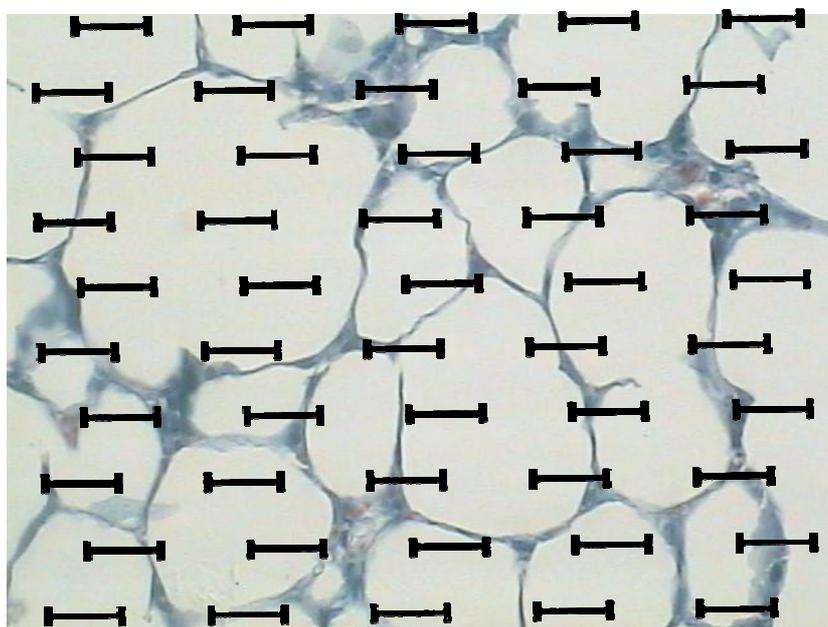
### **3.6. ESTUDO MORFOMÉTRICO DO PARÊNQUIMA PULMONAR**

Depois de terminada a fixação em formol, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 $\mu$ m de espessura. Este material foi submetido às colorações específicas descritas abaixo.

Todas as avaliações histopatológicas utilizadas neste estudo foram realizadas por meio da técnica de contagem de pontos e retas (Weibel, 1963), com o auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida acoplado à ocular do microscópio óptico comum (*CH30, Olympus, Japão*) (Figura 7). Vários autores já demonstraram previamente que este método é adequado para a quantificação destes índices (Garcia et al., 1994; Sakae et al., 1995; Warth et al., 1995, Tibério et al., 1997; Tibério et al., 2003; Leick-Maldonado et al., 2004). O observador que realizou todas as análises deste estudo não estava ciente a que grupo pertencia o tecido analisado.

Para garantir a homogeneidade das fatias de tecido pulmonar periférico utilizadas no presente estudo, foram analisadas as áreas fracionais de septo alveolar, de parede de vaso sanguíneo e de parede brônquica (proporção de estruturas), que foram determinadas pela técnica de contagem de pontos e retas. Para tanto, foram contados os pontos que coincidiam com cada uma das estruturas acima (camada endotelial, epitelial, músculo liso ou tecido conectivo) e divididos pelo número total de pontos de

tecido pulmonar. Esta análise foi realizada em todos os campos de cada lâmina, em aumento de 200X, e pontos coincidentes com espaços aéreos ou lúmen das vias aéreas ou dos vasos sanguíneos foram excluídos.



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

### **3.6.1. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS**

A coloração de LUNA foi utilizada para detecção de eosinófilos (Luna, 1986; Watanabe, 2004). Por meio da técnica de contagem de pontos e retas, foi avaliado o conteúdo de eosinófilos no tecido alveolar. Para tanto, foram quantificados o número de pontos que incidem no tecido alveolar e o número de células presentes nos septos alveolares em cada campo. A densidade de eosinófilos foi determinada pela razão do número de células e da área de tecido, no aumento de 1000x. Foram analisados 10 campos por corte, selecionados de forma randômica e os resultados foram expressos como células por unidade de área ( $10^4\mu\text{m}^2$ ) (Lanças et al., 2006, Angeli et al., 2008).

### **3.6.2. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE INOS**

Para a avaliação da iNOS, é necessário que o tecido seja congelado; portanto, foi realizada em outra fatia do parênquima pulmonar, em que foi gotejado OCT (*Optimum Cutting Temperature*) e congelado em nitrogênio líquido. O tecido foi posteriormente cortado no criostato (*Leica CM1850; Leica, Nofloch, Alemanha*), montado em lâminas pré-revestidas com aminopropiltriétoxisilane (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*) e fixado em solução de clorofórmio-acetona 1:1 (*Merck, Rio de Janeiro, Brasil*) vol/vol por 10 minutos em temperatura ambiente (Prado et al., 2005a). A imunohistoquímica foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por Coers et al. (1998) e já padronizada em nosso laboratório

(Prado et al., 2005a, Prado et al., 2006). Para tanto, os cortes foram incubados (30 min em temperatura ambiente) com uma solução bloqueadora contendo soro de camundongo normal (*Dako Corp., Carpinteria, CA, EUA*). Anticorpo monoclonal de camundongo anti-iNOS (*IgG2a iNOS/NOS Type II - Transduction Laboratories – N32020, San Diego, CA, EUA*) foi utilizado como anticorpo primário (incubado durante toda a noite em temperatura ambiente, diluição 1:5 em tampão TRIS). Após três lavagens em tampão TBS (*TRIS-buffered saline*) por 5 minutos, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (*LSAB+AP Link Universal, Dako Corp. Carpinteria, CA, EUA*) por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Os cortes foram então lavados 3 vezes com tampão TBS por 5 min e cobertos com fosfatase alcalina pré-diluída (*LSAB + AP- Streptavidin AP- Dako Corp., Carpinteria, CA, EUA*), por 30 minutos, seguido de incubação com substrato *Fast Red TR* (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*) por 6 min e submetidos à contra-coloração com hematoxilina por 1 minuto.

A contagem das células positivas para a expressão de iNOS foi realizada conforme descrito na avaliação da densidade de eosinófilos (item 3.6.1.). As células positivas para a expressão de iNOS foram analisadas no aumento de 1000X e foram avaliados 10 campos por lâmina. Os resultados foram expressos em células por unidade de área ( $10^4/\mu\text{m}^2$ ) (Prado et al., 2005a, Angeli et al., 2008).

### **3.6.3. AVALIAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS**

Para a avaliação das fibras colágenas, foi utilizada a coloração de Picro-Sírius no mesmo tecido citado anteriormente. Os cortes foram desparafinados e lavados com água. Após, foram corados por 1 hora no Picro-Sírius Red (*Direct Red 80, C.I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI, EUA*) à temperatura ambiente e posteriormente, lavada em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de *Harris* durante 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas.

Para detecção das fibras elásticas propriamente ditas e das fibras eulanínicas foi utilizada coloração com Resorcina-Fucsina. Para isto, os cortes foram desparafinados e hidratados em álcool 95%. Posteriormente, foram corados pela Resorcina-Fucsina por 1 hora e lavados em água corrente por 5 minutos. Foram então realizadas duas trocas de álcool 70% durante 10 minutos, sendo esta etapa a da diferenciação das fibras. Em seguida, foram desidratados, diafanizados e posteriormente montados.

O conteúdo de fibras colágenas e de fibras elásticas no tecido alveolar foi avaliado por meio da técnica de contagem de pontos e retas, já descrita anteriormente. O conteúdo de fibras elásticas ou colágenas no parênquima pulmonar foi determinado pela proporção de volume que se dá pela razão do número de pontos que incidem nas fibras colágenas ou elásticas e o número total de pontos que incidem no septo alveolar. Foram

analisados 10 campos de tecido pulmonar/animal em aumento de 400X. Os resultados foram expressos em porcentagem (Lanças et al., 2006; Angeli et al., 2008).

#### **3.6.4. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE ACTINA**

As fatias de parênquima pulmonar foram também submetidas à imunohistoquímica com anticorpo anti-actina. Para tanto, as lâminas foram desparafinadas e uma solução de peroxidase a 0,5% em metanol foi aplicada por 10 minutos para inibir a atividade de peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada com solução citrato por 30 minutos. Os cortes foram incubados com *Anti-Human Smooth Muscle Actin (1A 4, Dako, Dinamarca)* durante toda a noite a 4°C. O kit *LSAB® Plus-HRP (K-0690 DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA)* foi usado como anticorpo secundário e, como cromógeno, usamos o 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA*). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de *Harris*.

A quantificação da actina no tecido alveolar foi determinada de forma semelhante à utilizada no item 3.6.3. O conteúdo de actina no parênquima pulmonar foi determinado pela proporção de volume dada pelo número de pontos que coincidem com o tecido actina-positivo e o número total de pontos que incidem no tecido alveolar. Foram analisados todos os campos de cada lâmina no aumento de 200X. Os resultados foram expressos em porcentagem.

### **3.6.5. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE 8-EPI-PGF2 $\alpha$**

A imunohistoquímica para detecção do 8-iso-PGF2 $\alpha$  (isoprostano 8) foi realizada utilizando o anticorpo Anti-8-epi-PGF2 $\alpha$  (*Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, EUA*) com diluição de 1:500. Os blocos foram desparafinados e lavados 7 vezes por 5 minutos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10V 3% para inibir a atividade de peroxidase endógena. Após banhos em PBS e água, a recuperação do antígeno foi realizada com tripsina por 20 minutos. Após isto, 3 banhos de 3 minutos/cada em PBS foram realizados. Os cortes foram incubados com anticorpo Anti-8-epi-PGF2 $\alpha$  diluídos em BSA durante toda a noite. Após lavagem em PBS, *Vectastain ABC Kit (Vector Elite PK-6105, Burlingame, CA, EUA)* foi usado como anticorpo secundário e 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*) foi usado como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (*Merck, Rio de Janeiro, Brasil*).

A análise da expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$  no parênquima pulmonar foi realizada como previamente descrito na avaliação de fibras colágenas e elásticas, no item 3.6.3. Determinamos a proporção de volume de 8-epi-PGF2 $\alpha$  como a relação entre o número de pontos sobre a área do tecido corada com 8-epi-PGF2 $\alpha$  e o número total de pontos sobre o tecido pulmonar (Montuschi et al., 1999). As medidas foram realizadas em 10 campos/animal no aumento de 400X, sendo os resultados expressos em porcentagem.

### **3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

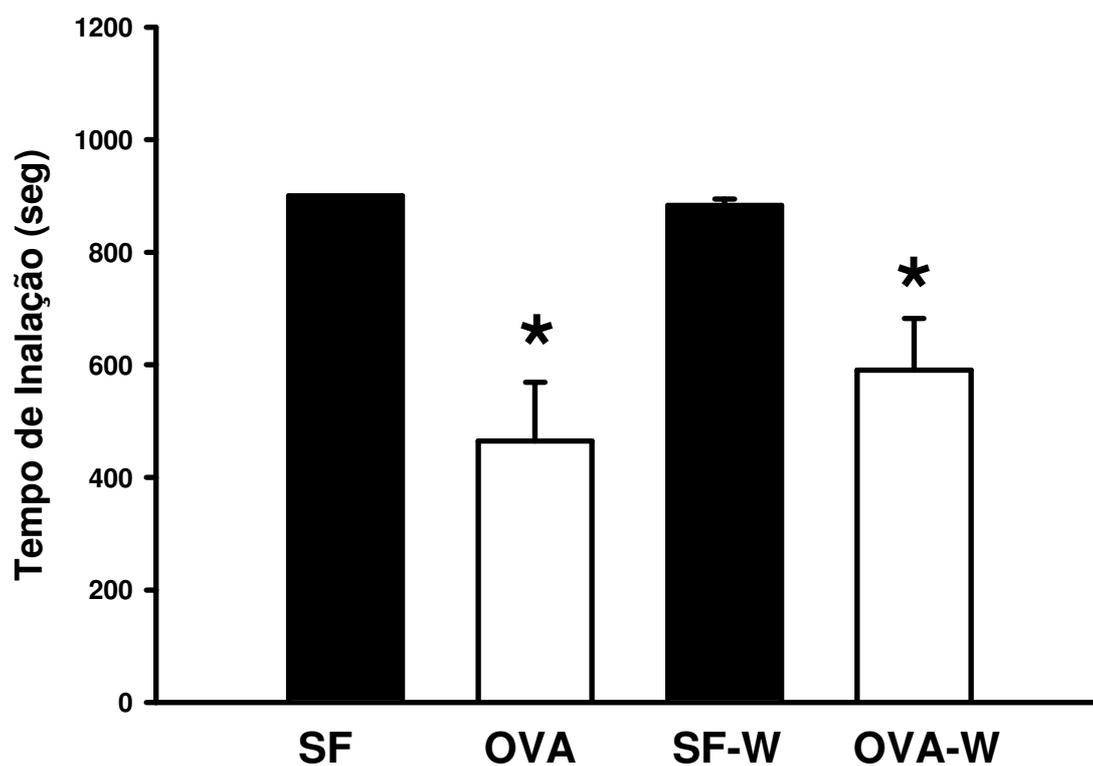
A análise estatística foi realizada usando o programa *SigmaStat* (*Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA*) sendo os valores expressos como média e erro padrão (EP) e representados em gráficos de barra de paralela e erro padrão.

Os dados foram avaliados pela análise de variância Two-Way (sensibilização X tratamento com 1400W) e comparações múltiplas foram feitas usando o método de *Holm-Sidak*. A correlação de *Spearman* foi utilizada para comparação entre os dados morfométricos e os dados funcionais. Foi considerado estatisticamente significativo um  $p < 0,05$  (Zar, 1984).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TEMPO DE INALAÇÃO (TI)

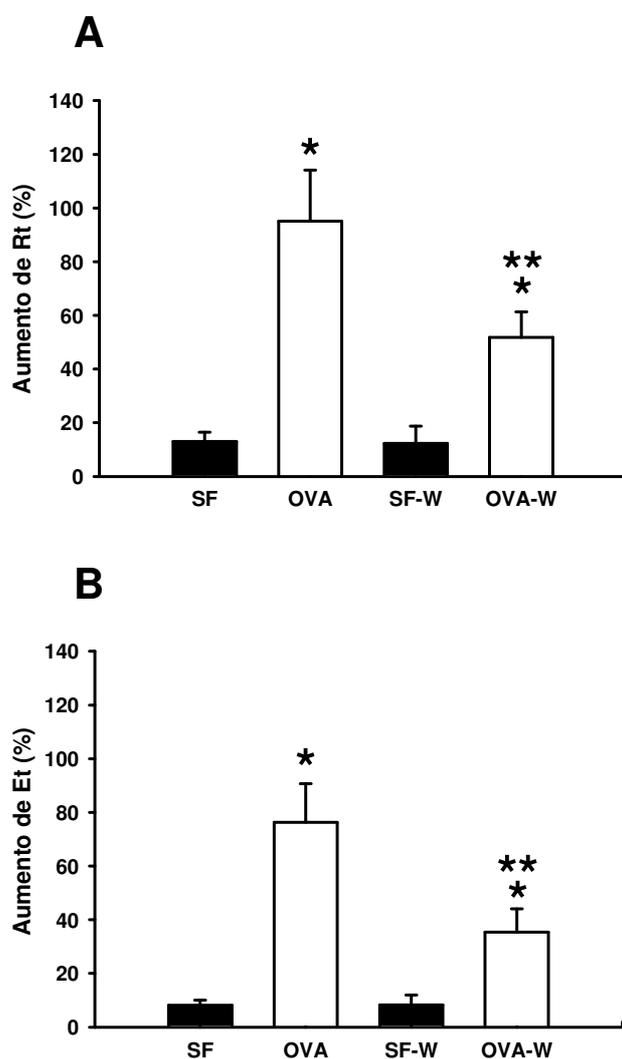
Os animais dos grupos controle SF e SF-W permaneceram em contato com a inalação de salina por 15 minutos durante as sete inalações. As cobaias dos grupos OVA e OVA-W apresentaram uma diminuição progressiva do tempo de contato com o antígeno inalatório (TI), sem desenvolver desconforto respiratório. Na Figura 6 apresentamos o TI da sétima e última inalação dos animais dos quatro grupos. Houve uma diminuição significativa no tempo de inalação quando comparamos os grupos sensibilizados OVA e OVA-W ( $565 \pm 69,79$  seg e  $637,42 \pm 60,44$  seg) aos grupos não sensibilizados SF e SF-W ( $900,00 \pm 69,79$  seg e  $900,00 \pm 60,44$  seg,  $p < 0,05$  para as duas comparações).



**Figura 8.** Valores de média e erro padrão (EP) dos valores de tempo de inalação (segundos) obtidos na 7<sup>a</sup> inalação dos quatro grupos experimentais. Os grupos OVA e OVA-W apresentaram uma redução do tempo quando comparados com os controles (\* $p < 0,05$ ).

## **4.2. AVALIAÇÃO DA MECÂNICA OSCILATÓRIA PULMONAR**

Não houve diferença na resistência tecidual (Rt) basal (Figura 9A) e na elastância tecidual (Et) basal (Figura 9C) entre os grupos estudados. Os animais expostos previamente à ovoalbumina apresentaram um aumento na %Rt (OVA:  $95,09 \pm 18,95$ ; OVA-W:  $51,77 \pm 9,58$ ) e %Et (OVA:  $76,25 \pm 14,45$ ; OVA-W:  $35,39 \pm 8,73$ ) comparados aos animais controle expostos a solução salina [%Rt (SF:  $13,12 \pm 3,38$ ; SF-W:  $12,38 \pm 6,33$ ); %Et (SF:  $8,19 \pm 1,88$ ; SF-W:  $8,30 \pm 3,72$ ),  $p < 0,05$  para todas as comparações]. O tratamento com 1400W nos animais expostos à ovoalbumina reduziu a %Rt e %Et comparado aos animais expostos à ovoalbumina e tratados com o veículo do 1400W ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Valores da média e erro padrão pós-desafio com OVA (porcentagem de aumento), de resistência (A) e de elastância (B) teciduais em cobaias previamente expostas a sete inalações com ovalbumina ou soro fisiológico tratados ou não com 1400W. \* $p < 0,05$  comparado aos animais dos grupos SF e SF-W, respectivamente; \*\* $p < 0,05$  comparado aos animais expostos à ovalbumina que receberam veículo de 1400W (grupo OVA).

### 4.3. ESTUDO MORFOMÉTRICO DO PARÊNQUIMA PULMONAR

#### 4.3.1. AVALIAÇÃO DE PROPORÇÃO DE ESTRUTURAS

Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto à proporção de estruturas pulmonares (septo alveolar, vias aéreas e vasos sanguíneos) nas fatias de tecido pulmonar periférico. Considerando a proporção de estruturas em cada grupo experimental estudado, nota-se que a proporção de septo alveolar (%) foi significativamente maior ( $\cong 90\%$ ) que a proporção de vias aéreas e vasos sanguíneos em todos os grupos ( $p < 0,001$  para todas as comparações).

<b>GRUPOS</b>	<b>Septo Alveolar</b>	<b>Vasos Sanguíneos</b>	<b>Vias Aéreas</b>
SF	87,98 $\pm$ 1,29	8,82 $\pm$ 0,77	2,54 $\pm$ 4,31
OVA	87,52 $\pm$ 2,59	9,77 $\pm$ 1,48	1,31 $\pm$ 3,29
SF-W	89,32 $\pm$ 0,93	8,36 $\pm$ 1,02	1,91 $\pm$ 3,22
OVA-W	89,50 $\pm$ 0,93	7,88 $\pm$ 0,66	2,51 $\pm$ 3,27

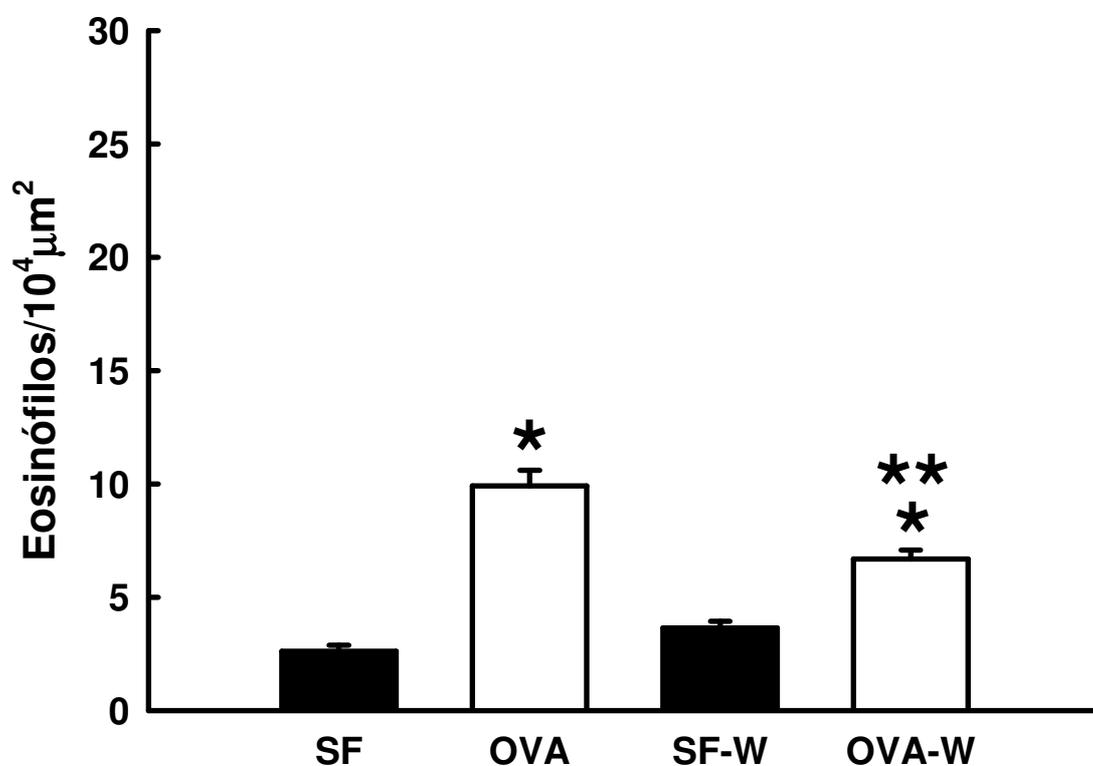
**Tabela 1.** Proporção de estruturas de alvéolos, vasos e vias aéreas no fragmento de tecido pulmonar periférico. Valores expressos em porcentagens com média e erro padrão.

#### **4.3.2. AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS**

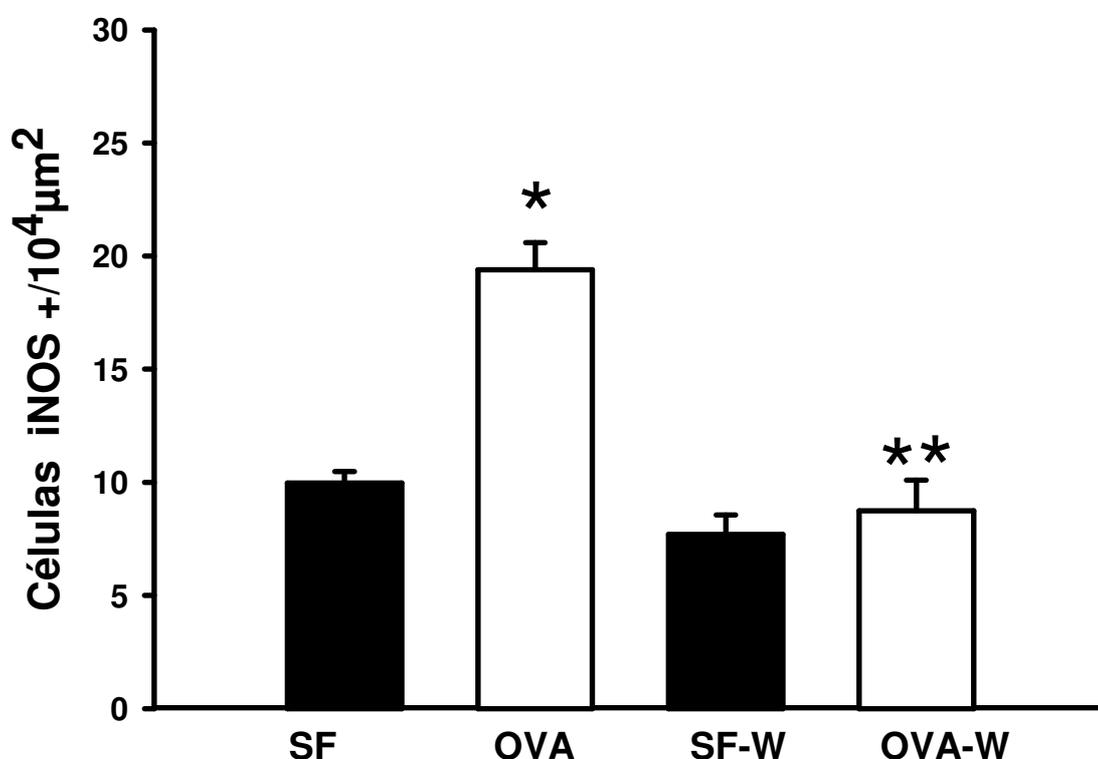
A Figura 8 representa os valores da média e EP da densidade de eosinófilos no septo alveolar. Houve aumento na densidade de eosinófilos nos animais expostos à ovoalbumina (OVA:  $9,91 \pm 0,47$ ; OVA-W:  $6,68 \pm 0,36$  células/ $10^4\mu\text{m}^2$ ) quando comparados aos animais expostos a salina (SF:  $2,55 \pm 0,39$ ; SF-W:  $3,65 \pm 0,42$  células/ $10^4\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,001$ ). Em animais expostos à ovoalbumina, o tratamento com 1400W reduziu o número de eosinófilos no septo alveolar comparado aqueles que receberam veículo de 1400W ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos expostos à solução salina.

#### **4.3.3. AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS POSITIVAS PARA INOS:**

Considerando a expressão de iNOS em células inflamatórias (Figura 11), as cobaias expostas à ovoalbumina que receberam veículo mostraram um aumento nas células positivas para iNOS no septo alveolar (OVA:  $19,38 \pm 1,21$  células/ $10^4\mu\text{m}^2$ ) quando comparados aos animais expostos a solução salina (SF:  $9,96 \pm 0,51$  células/ $10^4\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,001$ ). O tratamento com 1400W reduziu o número de células inflamatórias positivas para iNOS em animais expostos à ovoalbumina (OVA-W:  $8,74 \pm 1,36$  células/ $10^4\mu\text{m}^2$ ) quando comparado àqueles que receberam veículo de 1400W ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença nos animais expostos à solução salina.



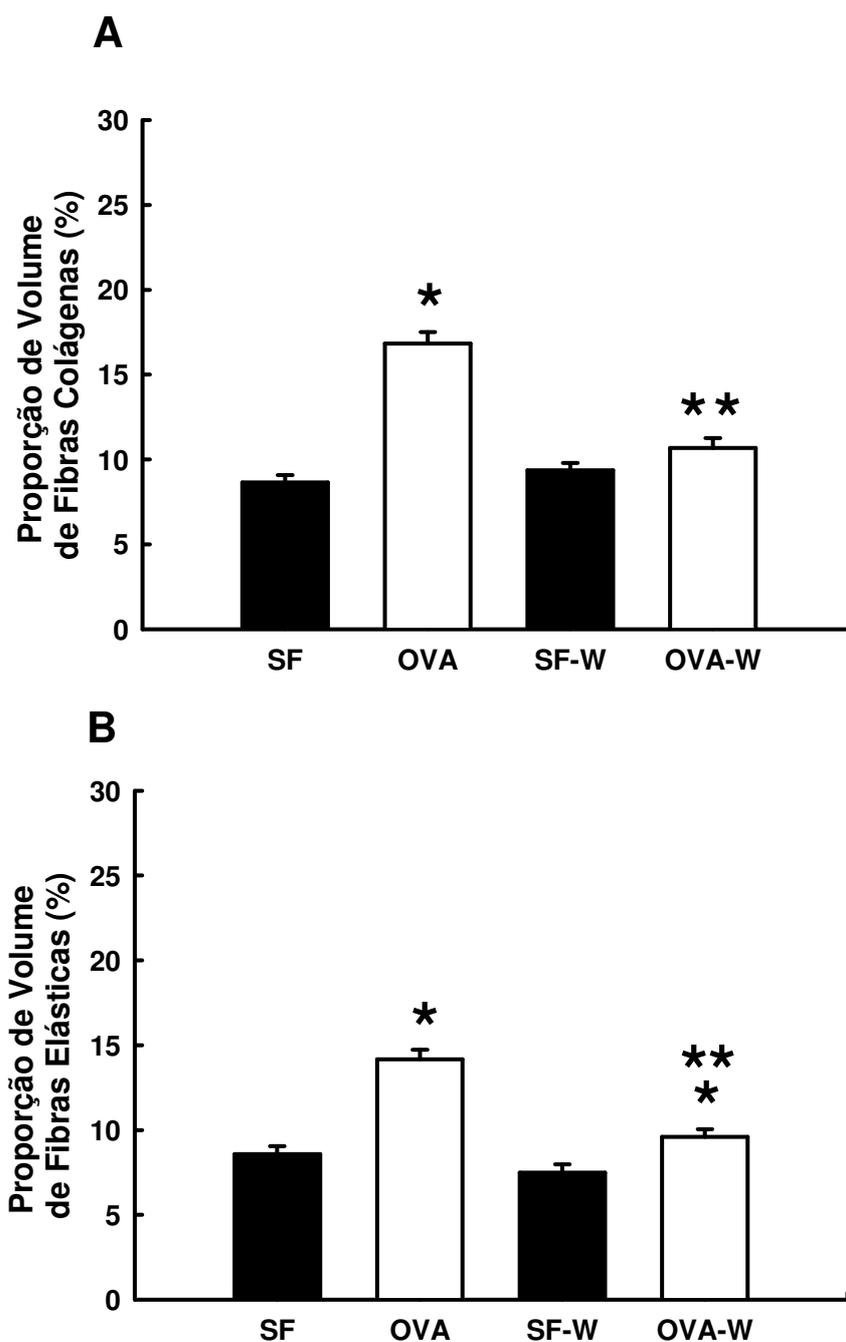
**Figura 10.** Valores de média e EP da densidade de eosinófilos em tecido pulmonar de cobaias previamente expostas a sete inalações com ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% (SF) e então tratados com 1400W ou veículo (SF); \* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos à inalação com soro fisiológico (grupos SF e SF-W, respectivamente); \*\* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos à ovoalbumina que receberam veículo de 1400W (grupo OVA).



**Figura 11.** Valores de média e EP da quantidade de células positivas para iNOS em tecido pulmonar de cobaias previamente expostos à ovoalbumina ou soro fisiológico 0,9% (SF) e então tratados com 1400W ou veículo (SF); \* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos ao soro fisiológico; \*\* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos à ovoalbumina que receberam veículo de 1400W (grupo OVA).

#### **4.3.4. AVALIAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS E ELÁSTICAS**

A Figura 10 mostra o conteúdo de fibras colágenas (painel A) e de fibras elásticas (painel B) no septo alveolar. Houve um aumento, tanto no conteúdo de fibras colágenas (OVA:  $16,84 \pm 0,67\%$ ) quanto no conteúdo de fibras elásticas (OVA:  $14,16 \pm 0,56$ ; OVA-W:  $9,27 \pm 0,46\%$ ) no septo alveolar em animais expostos à ovoalbumina comparativamente aos animais expostos ao soro fisiológico [Fibras colágenas (SF:  $8,65 \pm 0,43\%$ ); Fibras elásticas (SF:  $8,58 \pm 0,47$ ; SF-W:  $7,49 \pm 0,46\%$ ),  $p < 0,05$  para todas as comparações]. Os animais expostos à ovoalbumina que receberam tratamento com 1400W (OVA-W) apresentaram menor quantidade de fibras colágenas ( $10,68 \pm 0,58\%$ ) e elásticas ( $9,27 \pm 0,45\%$ ) no tecido periférico comparado aqueles que receberam veículo de 1400W (grupo OVA  $p < 0,001$ ). Não houve diferença nos grupos expostos à salina.



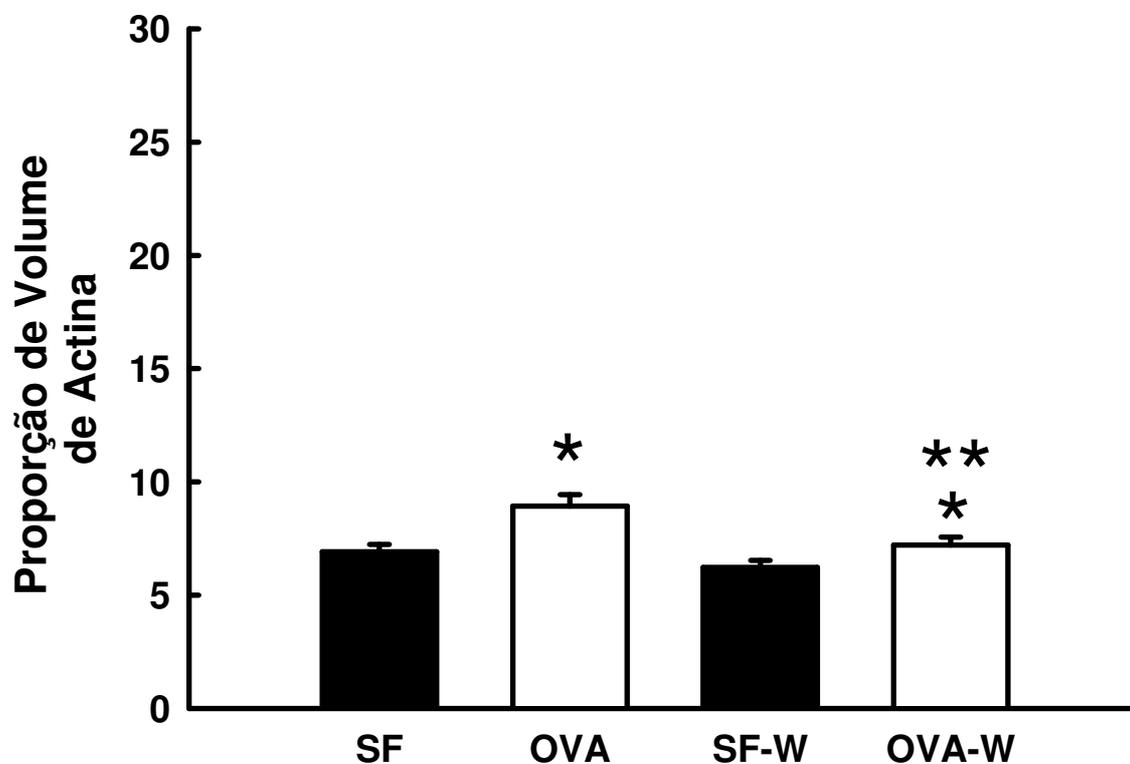
**Figura 12.** Valores de média e EP da proporção de volume de fibras colágenas (A) e elásticas (B) em cobaias previamente expostas à ovalbumina ou soro fisiológico 0,9% e tratados com 1400W ou não (tratados com veículo-soro fisiológico 0,9%); \* $p < 0,05$  comparado aos animais expostos a salina (grupos SF e SF-W) e \*\* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos à ovalbumina que receberam veículo de 1400W (grupo OVA).

#### **4.3.5. AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA ACTINA**

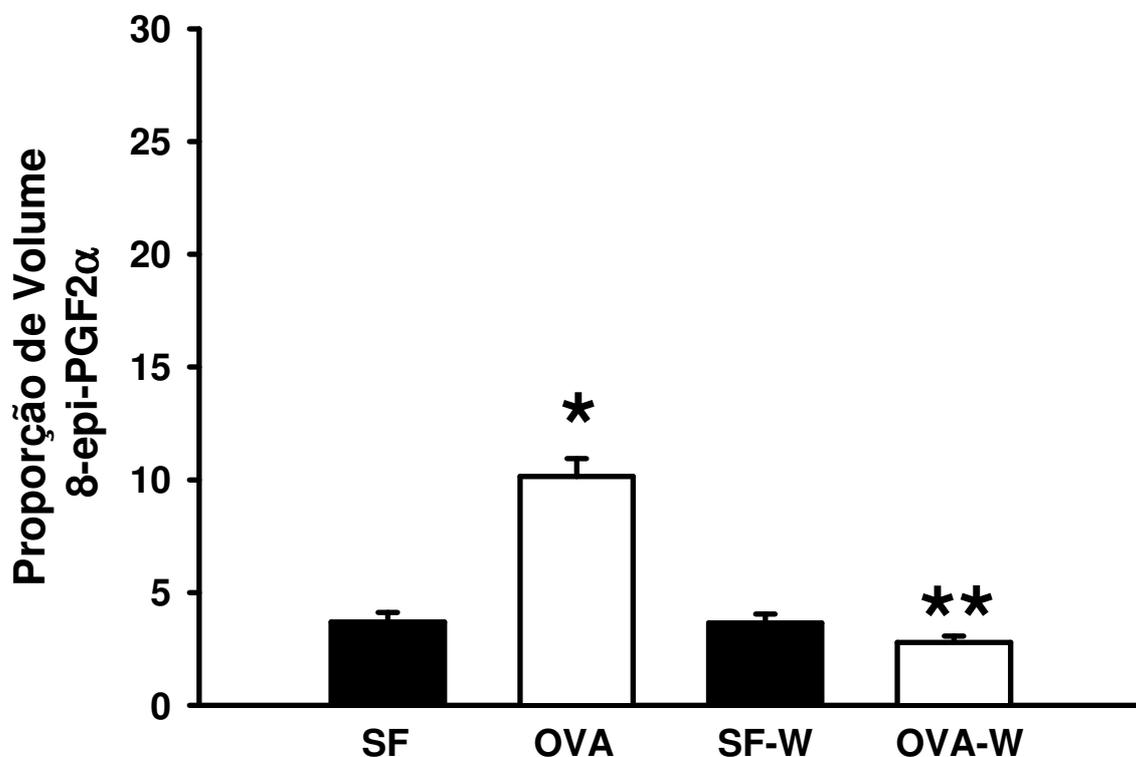
A Figura 11 demonstra a proporção de volume de actina. Houve um aumento no conteúdo de actina do septo alveolar em animais expostos à ovoalbumina (OVA:  $8,93 \pm 0,43$ ; OVA-W:  $7,22 \pm 0,33\%$ ) comparado aos animais expostos ao soro fisiológico (SF:  $6,91 \pm 0,36$ ; SF-W:  $6,23 \pm 3,33\%$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente)(Figura 13). Os animais tratados com 1400W e expostos à ovoalbumina (OVA-W) apresentaram uma menor quantidade de actina no tecido periférico quando comparados aqueles que receberam veículo de 1400W ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença significativa nos animais expostos a salina.

#### **4.3.6. AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE 8-EPI-PGF2 $\alpha$**

Os resultados da avaliação da expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$  estão mostrados na Figura 14. Observamos um aumento da expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$  no septo alveolar de cobaias expostas à ovoalbumina (OVA:  $10,15 \pm 0,80\%$ ) comparativamente às expostas somente a solução salina (SF:  $3,69 \pm 0,42\%$ ,  $p < 0,001$ ). O tratamento com 1400W reduziu esta resposta em animais expostos à ovoalbumina (grupo OVA-W:  $2,79 \pm 0,28\%$ ) comparado aos animais expostos à ovoalbumina que receberam veículo de 1400W ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa nos animais expostos à solução salina.



**Figura 13.** Valores de média e EP da proporção de volume de actina em cobaias previamente expostas à ovoalbumina ou soro fisiológico (0,9%) e tratados com 1400W ou não (tratados com veículo - soro fisiológico 0,9%); \* $p < 0,05$  comparado aos animais expostos com salina (grupos SF e SF-W, respectivamente) e \*\* $p < 0,01$  comparado aos animais expostos a ovoalbumina que receberam veículo de 1400W (grupo OVA).

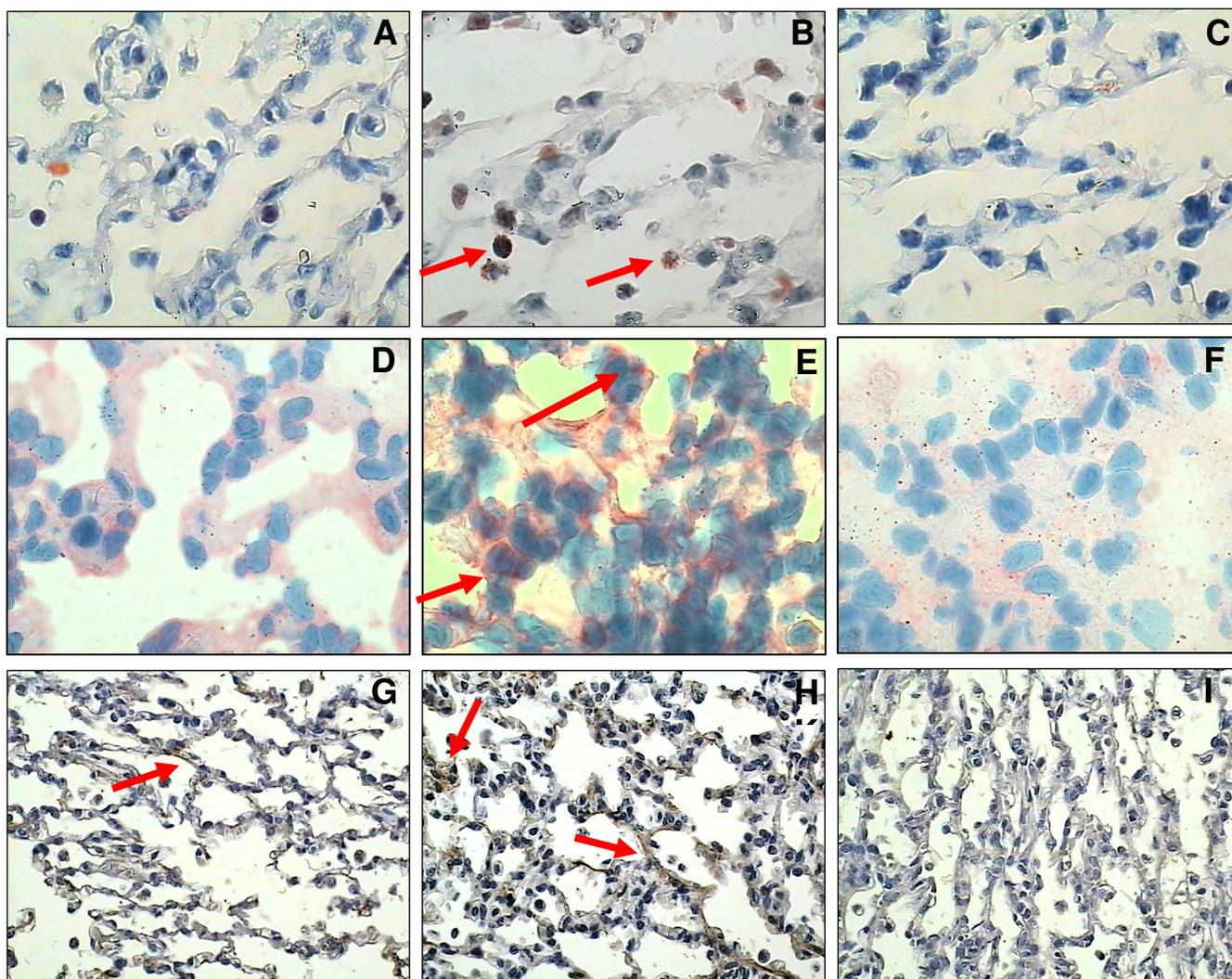


**Figura 14.** Valores de média e EP da proporção de volume de 8-epi-PGF2 $\alpha$  no septo alveolar de cobaias expostas à ovoalbumina ou soro fisiológico e que receberam tratamento com 1400W ou veículo; \* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos ao soro fisiológico e \*\* $p < 0,001$  comparado aos animais expostos à ovoalbumina que receberam veículo de 1400W (grupo OVA).

#### **4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS**

A Figura 15 mostra fotomicrografias representativas de tecido pulmonar periférico corados com LUNA para detecção de eosinófilos (Painéis A a C) e submetidos à imunohistoquímica para detectar células inflamatórias positivas para iNOS (Painéis D a F) e 8-epi-PGF2 $\alpha$  (Painéis G a I) de cobaias que receberam inalações com soro fisiológico (painéis A, D, G) ou ovoalbumina recebendo veículo (Painéis B, E, H) ou tratamento com 1400W (painéis C, F, I).

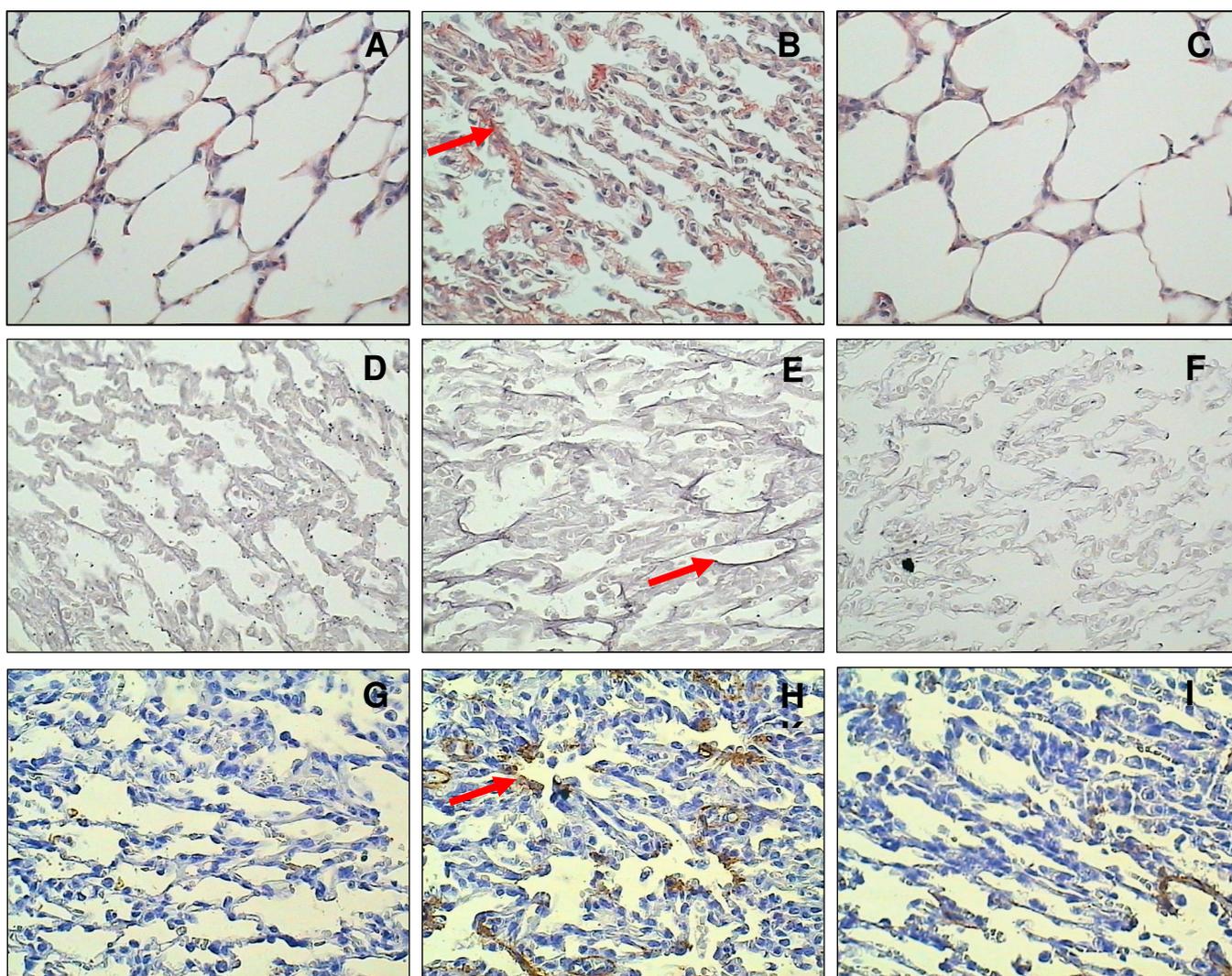
O tecido periférico de animais expostos à ovoalbumina apresentou uma proeminente infiltração eosinofílica, incluindo células positivas para iNOS, associado a um aumento na expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$ . Nas seções pulmonares de animais expostos cronicamente à ovoalbumina mas tratados com 1400W observamos atenuação no infiltrado eosinofílico, redução no número de células inflamatórias positivas para iNOS, além de diminuição na expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$  no septo alveolar (Painéis A a F x1000; G a I x400).



**Figura 15.** Amostras de tecido pulmonar periférico de cobaias obtidos dos animais controle (painéis A, D, G) e animais expostos à ovalbumina que receberam veículo (B, E, H) ou foram tratados com 1400W (C, F, I). O grupo controle mostra escasso número de eosinófilos (A), de células inflamatórias positivas para iNOS (D) e de positividade para 8-epi-PGF2 $\alpha$ . Em contraste, o parênquima pulmonar distal dos animais expostos à ovoalbumina e tratados com veículo mostram intensa infiltração eosinofílica (painel B) no septo alveolar, incluindo aumento na expressão de células inflamatórias positivas para iNOS (painel E) e do conteúdo de tecido positivo para 8-epi-PGF2 $\alpha$  (H) (ver setas). O tratamento com 1400W nos animais expostos à ovoalbumina reduziu todos estes parâmetros (Painéis C, F e I).

A Figura 16 mostra fotomicrografias representativas de tecido periférico, fixados com Picro-Sírius para detectar colágeno (A a C), Resorcina-Fucsina de Weigert para detectar fibras elásticas (D a F) e actina (G a I), de cobaias que receberam inalações com soro fisiológico (painéis A, D e G) ou aquelas que foram expostas repetidamente à ovoalbumina, recebendo veículo (Painéis B, E e H) ou tratamento com 1400W (painéis C, F e I).

O tecido periférico de animais expostos à ovoalbumina apresentou uma intensa deposição de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar e um aumento na densidade de actina. Nas seções pulmonares de animais expostos repetidamente à ovoalbumina, mas tratados com 1400W, observamos atenuação do remodelamento da matriz extracelular caracterizado pela diminuição do conteúdo de fibras colágenas e elásticas e da densidade de actina no septo alveolar (Painéis A a I x400).



**Figura 16.** Amostras de tecido pulmonar periférico de cobaias obtidos dos animais controle (painéis A, D, G) e animais expostos à ovoalbumina que receberam veículo (B, E, H) ou foram tratados com 1400W (C, F, I). O grupo controle mostra pequeno conteúdo de fibras colágenas, elásticas e de actina nas seções de tecido periférico, coincidente com a manutenção da histoarquitetura do septo alveolar. Em contraste, no parênquima pulmonar distal dos animais expostos à ovoalbumina e tratados com veículo observa-se aumento no conteúdo de fibras colágenas (C), elásticas (F) e actina (I) (ver setas). O tratamento com 1400W nos animais expostos à ovoalbumina reduziu todos estes parâmetros (Painéis C, F e I).

#### **4.5. CORRELAÇÃO**

Houve uma positiva e significativa correlação entre o número de células positivas para iNOS e %Rt ( $r=0,48$ ,  $p<0,05$ ), %Et ( $r=0,50$ ,  $p<0,05$ ), o conteúdo de fibras colágenas ( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ), o conteúdo de fibras elásticas ( $r=0,74$ ,  $p<0,001$ ) e a expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$  ( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Embora muitos estudos demonstrem os efeitos do óxido nítrico (NO) na modulação de alterações funcionais e morfológicas em vias aéreas proximais e distais de asmáticos e em modelos experimentais de inflamação crônica pulmonar (Belvisi et al., 1991; Dupuy et al., 1992; Prado et al., 2006), o papel do NO, particularmente da iNOS, na modulação destas alterações no parênquima pulmonar não foi previamente descrito.

Assim, apesar da asma ser considerada uma doença de vias aéreas, a contribuição das alterações do parênquima pulmonar na resposta asmática total é significativa (Montuschi et al., 1999; Dolhnikoff et al., 1999; Mauad et al., 2004). Neste contexto, há poucos anos atrás, Kraft et al. (1996) observaram a presença de infiltração eosinofílica alveolar em pacientes com asma noturna. Além disso, o mesmo autor (Kraft, 1999) também sugeriu que a melhora da função pulmonar distal correlacionava com a melhora dos sintomas da asma. Foi também demonstrado que há ligações alveolares anormais, com diminuição do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar de pacientes que morreram por asma fatal (Mauad et al., 2004). Coletivamente, estes dados sugerem que a resposta tecidual pulmonar tem um importante papel na resposta contrátil de humanos asmáticos.

Considerando que a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi detectada em várias células inflamatórias incluindo macrófagos, neutrófilos (Blackford et al., 1994), eosinófilos, mastócitos (Ferreira et al., 1998; Gilchrist et al., 2002), fibroblastos pulmonares (Romanska et al., 2002) e células epiteliais alveolares do tipo II (Warner et al., 1995), as quais estão presentes no parênquima distal e envolvidas na fisiopatologia da asma brônquica, torna-se relevante avaliar o papel da ativação desta isoenzima na modulação das respostas morfofuncionais do parênquima pulmonar decorrentes da presença de um processo inflamatório crônico.

No presente estudo, demonstramos que a ativação da iNOS contribui para a potencialização das alterações inflamatórias e do remodelamento do parênquima pulmonar em cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica. O inibidor específico para iNOS, 1400W, diminuiu a elastância e a resistência do tecido pulmonar, assim como a infiltração eosinofílica, o conteúdo de fibras colágenas e elásticas e a proporção de volume de actina no tecido pulmonar periférico. Até o presente momento, este estudo forneceu a primeira evidência dos efeitos da inibição da iNOS no parênquima pulmonar distal em modelo de inflamação alérgica crônica pulmonar. Além disso, o bloqueio específico da iNOS também reduziu a expressão de 8-epi-PGF2 $\alpha$  no septo alveolar, previamente aumentado pelas repetidas exposições à ovalbumina. Este achados sugerem que, pelo menos em parte, os efeitos do NO derivado da iNOS no parênquima pulmonar dependem da ativação da via do estresse oxidativo.

Vários autores têm demonstrado que o NO derivado das isoenzimas constitutivas agem no tônus do músculo liso e que o NO derivado principalmente da iNOS regula a resposta inflamatória (Xiong et al., 1999, De Sanctis et al., 1999). Neste sentido, estudando modelo de inflamação alérgica aguda em ratos, Eynott et al. (2002) observaram que a inibição específica de iNOS utilizando SC-51 (inibidor inespecífico das NO sintases) reduziu a responsividade brônquica em valores próximos aos de animais controle.

O 1400W (inibidor específico da iNOS) apresenta uma seletividade *in vivo* pelo menos 100 vezes maior que a de outros inibidores, como a aminoguanidina (Garvey et al., 1997). Considerando que altas doses de 1400W (50 mg/kg i.p.) podem causar efeitos tóxicos, como acometimento cardíaco e neurológico, podendo levar ao óbito, optamos por utilizar uma dose menor (2 mg/kg i.p. por quatro dias), cuja eficácia terapêutica já foi previamente demonstrada (Prado et al., 2006). No presente estudo, foi confirmada a eficácia deste protocolo, uma vez que houve redução no número de células positivas para iNOS no parênquima pulmonar dos animais expostos a ovalbumina e que foram tratados com 1400W.

Ao avaliarmos as alterações pulmonares funcionais induzidas pela inflamação crônica, observamos que o tratamento com 1400W diminuiu tanto a resposta de elastância quanto de resistência em animais expostos a ovalbumina, sugerindo que o NO derivado da iNOS contribui para o controle da resposta constritora do parênquima pulmonar neste modelo experimental.

É possível que estes efeitos de atenuação das respostas de elastância e resistência tecidual decorram da interação entre vários fatores como a diminuição da produção do NO derivado da iNOS, provavelmente secundário a uma redução no número de células positivas para iNOS, atenuação das respostas do estresse oxidativo, assim como uma redução no número de eosinófilos e do conteúdo de actina no tecido pulmonar de cobaias tratadas com 1400W.

A maneira pela qual a produção do NO derivado da iNOS leva a uma potencialização da mecânica tecidual pulmonar ainda não está totalmente esclarecida, mas pode estar relacionada à potencialização da produção de peroxinitritos, que são importantes agentes oxidantes formados pela interação entre o NO e o superóxido. Os peroxinitritos contribuem para a peroxidação lipídica e a partir do ácido araquidônico, são capazes de gerar uma família de isoprostanos, dentre eles os isômeros F2-isoprostano. A maior utilidade dos F2-isoprostanos diz respeito à quantificação da peroxidação lipídica e a condição de estresse oxidante *in vivo* (Morrow et al., 1994).

Além disso, os isoprostanos contribuem para a contração do músculo liso, agindo por meio das enzimas tirosina quinase, Rho and Rho quinase levando à diminuição da atividade da fosfatase de cadeia leve da miosina, aumentando o nível de miosina fosforilada de cadeia leve e, conseqüentemente, à contração (Janssen, 2001).

Considerando que radicais livres podem ser formados a partir de células inflamatórias que são ativadas nas vias aéreas de pacientes asmáticos, a descoberta que o 8-epi-PGF2 $\alpha$  atua na contração das vias aéreas apresenta uma importância fisiopatológica relevante. Wood et al. (2000) avaliaram o papel do 8-epi-PGF2 $\alpha$ , como um marcador de estresse oxidativo em crianças asmáticas, e demonstraram que níveis plasmáticos de 8-epi-PGF2 $\alpha$  aumentavam de acordo com a gravidade clínica da doença e com o uso de corticóides inalatórios.

A família E2 e D2-isoprostanos são formados competitivamente com F2-isoprostanos pelo mesmo mecanismo, sendo o anel E2-isoprostanos, análogo ao 15-F2-isoprostano (ou 8-epi-PGF2 $\alpha$ ), além de apresentarem propriedades biológicas muito similares ao mesmo. Há ainda evidências de que a formação do 8-epi-PGF2 $\alpha$  é mais favorecida em relação aos seus isômeros (Morrow et al., 1990; 1994). Desta forma, optamos pela utilização de uma técnica imunohistoquímica para detecção de 8-epi-PGF2 $\alpha$  por ser um dos principais marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e um dos principais membros da família dos isoprostanos. Com o intuito de permitir uma melhor correlação dos achados morfométricos com os funcionais, utilizou-se para a análise imunohistoquímica o mesmo tecido pulmonar que foi previamente submetido ao protocolo de avaliação da mecânica oscilatória. Cabe ressaltar que o fato deste tecido ser submetido previamente ao protocolo de avaliação da mecânica não interfere na técnica de imunohistoquímica, uma vez que a mesma avaliação no pulmão

contralateral demonstrou resultados semelhantes aos obtidos no tecido pulmonar utilizado neste trabalho, como previamente demonstrado por Angeli et al., 2008, em nosso laboratório.

O 8-epi-PGF2 $\alpha$  tem sido detectado em todos os tecidos humanos e fluidos biológicos, sendo que no pulmão tem sido investigado no lavado broncoalveolar, no ar exalado, células epiteliais, macrófagos, músculo liso de vasos e vias aéreas e no colágeno pulmonar (Milne et al., 2008). Talati et al. (2005) investigando o papel dos radicais livres em ratos submetidos à dieta anti-oxidante, demonstrou um aumento da imunoreatividade ao 8-epi-PGF2 $\alpha$  nas células epiteliais das vias aéreas e em macrófagos pulmonares nos animais sensibilizados quando comparados ao controle.

É interessante notar que houve uma diminuição significativa na densidade de 8-epi-PGF2 $\alpha$  no tecido pulmonar das cobaias expostas repetidamente à ovoalbumina e tratadas com 1400W. Estes achados corroboram o fato da produção de NO derivado da iNOS aumentar a série de reações químicas do estresse oxidativo, o qual pode ter efeitos deletérios no parênquima pulmonar, com repercussões funcionais significativas.

Observamos que a inibição específica de iNOS com 1400W reduziu o recrutamento eosinofílico. Outros autores também já mostraram que a produção de NO derivado da iNOS contribui para o recrutamento eosinofílico nas vias aéreas. Xiong et al. (1999) usando um modelo de sensibilização com ovoalbumina demonstraram que a infiltração de células inflamatórias,

particularmente eosinófilos, é significativamente menor em ratos geneticamente modificados para não expressarem a iNOS, que em ratos normais.

Com o mesmo modelo animal usado no presente estudo, demonstramos previamente, um aumento no número de eosinófilos que expressam tanto a óxido nítrico sintase neuronal quanto a iNOS, ao redor das vias aéreas dos animais sensibilizados. Observamos ainda que, neste estudo, o tratamento com 1400W reduziu a responsividade das vias aéreas, a infiltração eosinofílica e o remodelamento extracelular induzido pela inflamação alérgica crônica (Prado et al., 2005, 2006).

Porém, outros estudos não foram capazes de detectar este efeito (Koarai et al., 2002; Hickman-Davis et al., 2004). Eynott et al. (2002), estudando ratos sensibilizados, apesar de observar um aumento na hiperresponsividade, não conseguiram observar um efeito da inibição específica de iNOS, por meio de um inibidor inespecífico de NO sintase (SC-51) no recrutamento de eosinófilos e linfócitos, notando apenas um efeito no número de neutrófilos.

Entretanto, diante destes resultados aparentemente contraditórios, devemos considerar a diferença do tipo de inibidor utilizado, diferenças nos protocolos experimentais e nas espécies animais utilizadas. Além disso, estes resultados podem diferir em função de efeitos dependentes da concentração, fluxo e origem do NO, que podem influenciar a

eosinofiloiose, o recrutamento eosinofílico e a apoptose destas células. Neste sentido, Taylor et al. (2003) sugerem que o NO possa ter efeitos tanto apoptóticos como anti-apoptóticos e que estas respostas dependem da concentração do óxido nítrico e também da célula produtora de origem. Além disso, deve-se ressaltar que os efeitos no recrutamento celular podem ser devidos a efeitos indiretos na produção de outros mediadores inflamatórios influenciados pelo óxido nítrico.

Neste estudo, a avaliação do conteúdo das fibras colágenas e elásticas foi realizada para investigar o quanto a inibição da iNOS, neste modelo animal de inflamação tecidual pulmonar, afeta o remodelamento pulmonar, particularmente no septo alveolar, uma vez que o depósito destas fibras são características importantes do processo de remodelamento pulmonar observado em pacientes asmáticos (Dolhnikoff et al., 1999; Mauad et al., 2004; Tagaya e Tamaoki, 2007). Observamos que os animais expostos a ovalbumina apresentaram um aumento no conteúdo de fibras colágenas e elásticas no septo alveolar e o tratamento com o inibidor específico, 1400W, atenuou estas respostas.

Considerando a deposição de fibras elásticas, uma possível explicação para a inibição do conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar pode estar relacionada aos efeitos dos agentes oxidantes derivados do estresse oxidativo, agindo como agente pró-elastolítico via ativação da elastase.

Avaliando os efeitos de agentes oxidantes na atividade da elastase *in vitro*, Cantor et al. (2006) sugerem que o peróxido de hidrogênio e outros oxidantes derivados de células inflamatórias ou do meio ambiente, agem como agentes primários da quebra de fibras elásticas mediadas pela elastase, aumentando a fase de ressíntese, o que pode levar algumas vezes, a uma organização morfológica anormal com propriedades funcionais anormais.

Observamos uma importante redução na expressão de 8-epi-PGF-2 $\alpha$  nos animais expostos a ovoalbumina e tratados com 1400W quando comparado com os animais não tratados. Além disso, houve também uma correlação positiva e significativa entre o conteúdo de fibras elásticas e o número de células positivas para iNOS ( $r=0.735$ ,  $p<0.001$ ), assim como com a proporção de volume de 8-epi-PGF-2 $\alpha$  ( $R=0.525$ ,  $p<0.05$ ) no parênquima pulmonar.

Demonstramos que o tratamento com 1400W reduziu o conteúdo de fibras colágenas no tecido pulmonar de cobaias com inflamação pulmonar alérgica crônica. De fato, observamos uma correlação positiva e significativa entre o número de células positivas para iNOS e o conteúdo de fibras colágenas no tecido pulmonar ( $r=0.528$ ,  $p<0.05$ ). O óxido nítrico tem sido investigado como um modulador da síntese de colágeno agindo na via dependente de cGMP (Perkins et al., 1998).

Hsu et al. (2007) demonstraram que a inibição de iNOS pelo 1400W em fibroblastos pulmonares reduz a fibrose pulmonar difusa induzida por lipopolissacarídeos em ratos, tendo, portanto, um papel no desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida pelo NO. Há evidências de que a via sinalizadora do NO aumenta a expressão de TGF-beta 1, TIMP-1 e HSP47 em fibroblastos pulmonares, que ativam coletivamente a cascata sinalizadora SMAD, estimulando o processo de remodelamento. Prado et al. (2006) também demonstraram que a inibição do NO pelo tratamento com 1400W reduziu o colágeno extracelular nas vias aéreas.

Outros mecanismos podem também estar envolvidos nestas respostas, como o aumento da biodisponibilidade da L-arginina para as formas constitutivas produtoras de NO, quando os animais são tratados com inibidores de iNOS (Meurs et al., 2000), além dos efeitos do NO nas metaloproteinases. Neste sentido, Hogaboam et al. (1998) observaram um aumento na expressão dos receptores de quimiocinas (CCR2 e CCR3) e supra-regulação das citocinas pró-fibróticas pulmonares (MCP-1 e MIP-1 $\alpha$ ) em modelo de granuloma pulmonar não fibrótico em ratos pré-sensibilizados. Estas citocinas impedem a síntese de metaloproteinases, as quais estão envolvidas na clivagem das fibras colágenas. As alterações nas citocinas, quimiocinas e no perfil pró-colágeno podem ser devido a um efeito direto do NO no fibroblasto pulmonar e fornecem um importante sinal da regulação da atividade fibroblástica durante a evolução da doença pulmonar crônica.

Finalmente, também observamos um aumento na proporção de volume de actina no tecido pulmonar de cobaias submetidas a exposições repetidas a ovalbumina. A inibição da produção de NO derivada da ativação da iNOS reduziu este conteúdo. Embora não seja uma evidência direta, os dados acima sugerem um efeito do NO derivado da iNOS, particularmente nos miofibroblastos, que são uma das principais células responsáveis pela produção da matriz extracelular e pela contração do parênquima pulmonar (Hogaboam et al., 1998; Hsu et al.; 2007).

Assim, os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que a iNOS está envolvida na fisiopatogenia da asma, corroborando com as alterações funcionais, inflamatórias e de remodelamento de tecido pulmonar, atuando pelo menos parcialmente via ativação do estresse oxidativo. A relevância deste estudo está na elucidação de mecanismos fisiopatológicos presentes na asma brônquica e também na possível contribuição com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento clínico destes pacientes.

## 6. CONCLUSÃO

Neste modelo de inflamação alérgica pulmonar crônica induzida por múltiplas exposições à ovoalbumina em cobaias foi possível observar que:

1. O óxido nítrico derivado da ativação da iNOS está envolvido na constrição do tecido pulmonar periférico, tanto em relação a resistência quanto em relação a elastância tecidual;
2. O óxido nítrico derivado da iNOS atua como modulador pró-inflamatório, amplificando a inflamação eosinofílica;
3. A amplificação do remodelamento pulmonar, particularmente a deposição de fibras colágenas e elásticas, tem o óxido nítrico derivado da iNOS atuando como mediador pró-fibrótico.
4. Os efeitos do óxido nítrico derivado da iNOS amplificando as alterações do parênquima pulmonar podem ser, pelo menos em parte, relacionados ao aumento do estresse oxidativo;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209(7):1297-302.

Adcock IM, Brown CR, Kwon O, and Barnes PJ. Oxidative stress NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:1518– 1524.

Amorim AJ, Daneluzzi JC. Prevalence of asthma in schoolchildren. *J Pediatr.* 2001;77:197-202.

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

Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(21):10089-93.

Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):12-24.

Avila PC, Segal MR, Wong HH, Boushey HA, Fahy JV. . Predictors of late asthmatic response. Logistic regression and classification tree analyses. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):2092

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

Baddedge RC, Moore PK, Gathen Z, Hart SL. L-NG-nitroarginine p-nitroanilide (L-NAPNA): a selective inhibitor of nitric oxide synthase in the brain. *Br J Pharmacol*. 1993;107:194P.

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

Baraldi E, Azzolin NM, Zanconato S, Dario C, Zacchello F. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatr*. 1997;131(3):381-5.

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

Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. 1996;51:218-20.

Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(3):437-44.

Belvisi MG, Stretton D, Barnes PJ. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol*. 1991;198(2-3):219-21.

Birrell MA, McCluskie K, Haddad E-B, Battram CH, Webber SE, Foster ML, Yacoub MH, Belvisi MG. Pharmacological assessment of the nitric-oxide synthase isoform involved in eosinophilic inflammation in a rat model of sephadex-induced airway inflammation. *J Pharm Experim Therap*. 2003;304:1285-91.

Blackford JA, Antonini JMJ, Castanova V and Dey RD. Intratracheal instillation of silica up-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and increases nitric oxide production in alveolar macrophages and neutrophils. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;11:426-431.

Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55(8-9):1015-28.

Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boutet M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest.* 1997;112(1):45-52.

Bousquet J, Chanaz P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Verge P, Ahlstedt D, Simony-La fontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 1990;323:1033-9.

Bousquet J, Jeffery P.K., Busse W.W., Jonhson M and Vignola A.M. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000;161:1720-1745.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:9030-3.

Bredt DS, Hwang MP, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990;347:768-70.

Bult H, Boeckstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, and Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature.* 1990;345: 346– 347.

Burrows B, Martinez FD, Hanolen M, Barbee Ram Cline MG. Association of asthma with serum IgE: levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med*. 1989;320:271-7.

Cabral AL, Conceição GM, Fonseca-Guedes CH, Martins MA. Exercise-induced bronchospasm in children: effects of asthma severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1819-23.

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.

Canning BJ and Undem BJ. Evidence that distinct neural pathways mediate parasympathetic contractions and relaxations of guinea-pig trachealis. *J Physiol*. 1993;471:25–40.

Canning BJ, Fischer A. Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *Am J Physiol*. 1997;272:L731-8.

Cantor OJ, Shteyngart B, Cerreta MJ, Shuren M and Turino MG. Synergistic effect of hydrogen peroxide and elastase on elastic fiber injury *in vitro*. *Exp Biol Med*. 2006 ;231:107-11.

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

Cerchiaro GA, Scavone C, Texeira S, Sannomiya, P. Inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils: role of insulin. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(3):357-62.

Chiappara G, Gagliardo R, Siena A, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G, Vignola AM. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(1):85-93.

Christopherson KS, Brecht DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*. 1997;100(10):2424-9.

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

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

Culotta E, Koshland DE. NO news is good news. *Science*. 1992;258:1862-3.

De Magalhães SS, dos Santos MA, da Silva OM, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, Martins AM, Saldiva PH, Mauad T and Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 2005;35:602-611.

De Sanctis GT, MacLean JA, Hamada K, Mehta S, Scott JA, Jiao A, Yandava CN, Kobzik L, Wolyniec WW, Fabian AJ, Venugopal CS, Grasmann H, Huang PL, Drazen JM. Contribution of nitric oxide synthases 1, 2 and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. *J Exp Med* 1999;189(10):1621-1630.

Del Pozo V, de Arruda-Chaves E, de Andres B, Cardaba B, Lopez-Farre A, Gallardo S, Cortegano I, Vidarte L, Jurado A, Sastre J, Palomino P, Lahoz, C. Eosinophils transcribe and translate messenger RNA for inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*. 1997;158(2):859-64.

Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, Annesi-Maesano I, Boussaha M, Bousquet J, Charpin D, Degioanni A, Gormand F, Grimfeld A, Hochez J, Hyne G, Lockhart A, Luillier-Lacombe M, Matran R, Meunier F, Neukirch F, Pacheco Y, Parent V, Paty E, Pin I, Pison C, Scheinmann P, Thobie N, Vervloet D, Kauffmann F, Feingold J, Lathrop M, Demenais F. Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(5):1812-8.

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

Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA and Zapol WM. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest.* 1992;90:421-42.

Durham SR, Lee TH, Cromwell O, Shaw RJ, Merret TG, Merret J, Cooper P, Kay AB. Immunologic studies in allergen-induced late asthmatic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* 1984;74:49-60.

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

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

Ermert M, Ruppert C, Gunther A, Duncker HR, Seeger W, and Ermert L. Cell-specific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs. *Lab Invest.* 2002;82:425–441.

Eynott PR, Groneberg DA, Caramori G, Adcock IM, Donnely LE, Kharitonov S, Barnes PL and Chung KF. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;452:123-133.

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

Feletou M, Lonchamp M, Coge F, Galizzi JP, Bassoullet C, Merial C, Robineau P, Boutin JA, Huang PL, Vanhoutte PM, Canet E. Regulation of murine airway responsiveness by endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(1):L258-67.

Ferreira HH, Bevilacqua E, Gaglioti SM, De Luca IM, Zanardo RC, Teixeira CE, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998;358(3):253-9.

Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, Kummer W. Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett.* 1993 Jan 12;149(2):157-60.

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994;23:1121-31.

Fowler MG, Davenport MG, Garg R. School functioning of US children with asthma. *Pediatrics.* 1992;90(6):939-44.

Gabazza EC, Taguchi O, Tamaki S, Murashima S, Kobayashi H, Yasui H, Kobayashi T, Hataji O, Adachi Y. Role of nitric oxide in airway remodelling. *Clin Sci.* 2000;8(3):291-4.

Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao X-Q, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh Y, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-Oka S, Inoko H, HO LP, Shirakawa T, Hopkin JM. Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochem Biophys Res Comm.* 2000;267:761-3.

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

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

Gilchrist M, Savoie M, Nohara O, Wills FL, Wallace JL and Befus AD. Nitric oxide synthase and nitric oxide production in *in vivo*-derived mast cells. *J. Leukoc. Biol.* 2002;71:618-624.

Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and Prevention Program (GINA) 2007. Available from: <http://www.ginasthma.org>

Grasemann H, Yandava CN, Drazen JM. Neuronal NO synthase (NOS1) is a major candidate gene for asthma. *Clin Experim Allergy.* 1999;29:39-41.

Griffith MJ, Liu S, Curzen NP, Messent M, and Evans TW. *In vivo* treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1995;268:L509–L518.

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

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FBJM, Erzurum SC. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:7809-13.

Haddad EB, Liu SF, Salmon M, Robichaud A, Barnes PJ, Chung KF. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in Brown Norway rats

exposed to ozone: effect of dexamethasone. *Eur J Pharmacol.* 1995;293(3):287-90.

Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR et al. Inflammatory cell distribution within and along asthmatics airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:565-72.

Hamad AM, Knox AJ. Mechanisms mediating the antiproliferative effects of nitric oxide in cultured human airway smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2001;506(2):91-6.

Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet.* 1993;342:1510-3.

Hamid QA. Peripheral inflammation is more important than central inflammation. *Respir Med.* 1997;91:11–12.

Hibbs JB, Taintor RR, Vaurin Z. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:6369-73.

Hogaboam CM, Gallinat CS, Bone-Larson C, Chensue SW, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Collagen deposition in a non-fibrotic lung granuloma model after nitric oxide inhibition. *Am J Pathol.* 1998;153:1861-72.

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

Hsu YC, Wang LF, Chien YW. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* 2007;42:599-607.

- Hunt LW Jr, Silverstein MD, Reed CE, O'Connell EJ, O'Fallon WM, Yunginger JW. Accuracy of the death certificate in a population-based study of asthmatic patients. *JAMA*. 1993;269(15):1947-52.
- Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P, and Holgate ST. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:548–557.
- Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*. 2002;53:503-14.
- Imasaki T, Kobayashi H, Hataishi R, Hayashi I, Tomita T, Majima M. Nitric oxide is generated in smooth muscle layer by neurokinin A and counteracts constriction in guinea pig airway. *Nitric oxide*. 2001;5:465-74.
- James AJ. Relationship between airway wall thickness and airway hyperresponsiveness. In: Stewart AG (ed). *Airway wall remodeling in asthma*. Boca Raton (FL): CRC Press, 1997;1-27.
- Janssen LJ. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol*. 2001;280:L1067–82.
- Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):176-83.
- Kaliner MA, Barnes PJ, Persson CGA. *Asthma. Its Pathology and Treatment*. New York: 2nd ed. Marcel Decker Inc.;1991.
- Kang, HK, Morrow, JD, Roberts, LJ, Newman, JH and Banerjee, M. Airway and Vascular Effects of 8-Epi-prostaglandin F<sub>2</sub>α in Isolated Perfused Rat Lung. *J. Appl. Physiol*. 1993;74:460–465.

Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG. 8-epi-PGF<sub>2</sub>alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:590–596.

Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9:28-33.

Kelly EA, Busse WW, Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in the airway after allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(3Pt1):1157-61.

Kesler BS, Canning BJ. Regulation of baseline cholinergic tone in guineapig airway smooth muscle. *J Physiol. (Lond)* 1999;518:843–856.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(13):5159-62.

Koarai A, Ichinose M, Sugiura H, Tomaki M, Watanabe M, Yamagata S, Komaki Y, Shirato K, Hattori T. iNOS depletion completely diminishes reactive nitrogen-species formation after an allergic response. *Eur Respir J.* 2002;20:609-616.

Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D and Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:371–377.

Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 1994;Dec 8;372(6506):546-8.

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

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

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:697-704.

Laitinen T, Ollikainen V, Lázaro C, Kauppi P, de Cid R, Antó JM, Estivill X, Lokki H, Mannila H, Laitinen LA, Kere J. Association study of the chromosomal region containing the FCER2 gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3Pt1):700-6.

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

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

Larsson AK, Bäck M, Hjoberg J, Dahlén SE. Inhibition of nitric-oxide synthase enhances antigen-induced contractions and increases release of cysteinyl-leukotrienes in guinea pig lung parenchyma: nitric oxide as a protective factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(1):458-65.

Lauzon AM and Bates HT. Estimation of time-varying respiratory mechanical parameters by recursive least squares. *J Appl Physiol.* 1991;71:1159-1165.

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

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor  $\beta$  (1). *J Exp Med.* 2001;194:809-21.

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

Leick-Maldonado EA, Prado CM, Arata V, Kasahara DI, Martins MA, Tibério IFLC. Acute and chronic NO inhibition in a model of chronic airway inflammation in guinea pigs: lymphomononucleated and polymorphonucleated cell recruitment. *Eur Resp J.* 2003;22(Suppl45):106s. (Presented at European Respiratory Society 13th Annual Congress; 2003 Aug29-3Sep; Vienna, Austria. Abstract).

Li CG and Rand MJ. Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1991;102:91-94.

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

Ludwig MS and Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol.* 1994;77:2029-2035.

Lugogo NL, Kraft M. Epidemiology of asthma. *Clin Chest Med.* 2006;27(1):1-15.

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

Martinez FD, Helms PJ. Types of asthma and wheezing. *Eur Respir J Suppl.* 1998;27:3s-8s.

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

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

McCall TB, Palmer RM, Moncada S. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol.* 1991;21(10):2523-7.

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

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

Meurs H, Hamer MA, Pethe S, Vadon-Le GS, Boucher JL and Zaagsma J. Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *Br. J. Pharmacol.* 2000;30:1793-1798.

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 hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol.* 2002;136:391-8.

Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *TRENDS Pharmacol Sciences.* 2003;24(9):450-5.

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

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

Minshall EM, Hogg JC, and Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:386–390.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginina: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 1989;38:1709-15.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.

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.

Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(2):148-53.

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

Morrow JD, Minton TA, Badr KF, and Roberts LJ. *Biochim Biophys Acta.* 2nd. 1994;1210(2):244-248.

Morrow JD. The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des.* 2006;12(8):895-902.

Nagase T, Fukuchi Y, Dallaire MJ, Martin JG and Ludwig MS. In vitro airway and tissue responses to antigen in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;153:81-86.

Nakajima J, Ono M, Takeda M, Kawauchi M, Furuse A, Takizawa H. Role of costimulatory molecules on airway epithelial cells acting as allantigen presenting cells. *Transplant Proc.* 1997;29:2297-2300.

National Institute of Health/World Health Organization. National Asthma Education and prevention program. Expert panel Report 2. *Guidelines for the diagnosis and management of asthma.* Washington, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1997.

Offer S, Shoseyov D, Bibi H, Eliraz A, Madar Z. A leukotriene receptor antagonist modulates iNOS in the lung and in a leukotriene-free cell model. *Nitric Oxide.* 2003;9:10-7.

Ohbayashi H, Shimokata K. Matrix metalloproteinase-9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:177-181.

Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, Isoyama S, Tanno Y, Tamura G, Yamauchi K, Nagura H, Shirato K. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16:212-9.

Paré PD, Michoud MC, Boucher RC, Hogg JC. Pulmonary effects of acute and chronic antigen exposure of immunized guinea pigs. *J Appl Physiol*. 1979;46:346-53.

Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA. Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB J*. 1999;13(13):1810-6.

Pauwels R. The relationship between airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 1989;19:395-8.

Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax*. 1999;54:268-72.

Pechkovsky DV, Zissel G, Stamme C, Goldmann T, Ari Jaffe H, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, and Muller-Quernheim J. Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur Respir J*. 2002;19:672-683.

Perkins WJ, Pabelick C, Warner DO and Jones KA. cGMP-independent mechanism of airway smooth muscle relaxation induced by S-nitrosoglutathione. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1998;275:C468-C474.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara ID, Martins MA and Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea

pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005a;288(4):L741-8.

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

Prosser FH and Wahl LM. Involvement of the Ornithine Decarboxylase Pathway in Macrophage Collagenase Production. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1988;260:218-225.

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

Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang Y-CT. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am PJ Physiol.* 1998; 275(19):L96-L102.

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3375-8.

Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *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 Rev.* 2004;84:731-65.

Ricciardolo FL, Nijkamp FP and Folkers G. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets.* 2006;7(6):721-35.

Rio EBM, Gallo PR, Siqueira AAF. Mortalidade por asma no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 2002;36(2):146-54.

Robbins RA, Barnes PJ, Springall DR, Warren JB, Kwon OJ, Buttery LD, Wilson AJ, Geller DA, and Polak JM. Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203:209–218.

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

Romanska HM, Polak JM, Coleman RA, James RS, Harmer DW, Allen JC and Bishop AE. iNOS gene upregulation is associated with the early proliferative response of human lung fibroblasts to cytokine stimulation. *J Pathol.* 2002;197:372-379.

Sakae RS, Leme AS, Dolhnikoff M, Pereira PM, Warth MPTN, Zin WA, Saldiva PHN, Martins MA. Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacoline in Wistar rats. *Am J Physiol (Lung Cell Mol. Physiol. 12).* 1995;268:L23-9.

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

Salerno FG, Paré P, Ludwig MS. A comparative study of elastic properties of rat and guinea pig parenchymal strips. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3Pt1):846-52.

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

Santing RE, Olymulder CG, Zaagsma J, Meurs H. Relationships among allergen-induced early and late phase airway obstructions, bronchial hyperreactivity, and inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;93(6):1021-30.

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

Sedgwick JB, Holt PG. Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. *Immunology*. 1985;56:635-42.

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

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

Shiba K, Kasahara K, Nakajima H, Adachi M. Structural changes of the airway wall impair respiratory function, even in mild asthma. *Chest*. 2002;122(5):1622-6.

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

Summerhill E, Leavitt SA, Gidley H, Parry R, Solway J, Ober C. beta(2)-adrenergic receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung

function, but not with asthma, in the Hutterites. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(2Pt ):599-602.

Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 2007;56(4):331-40.

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.

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.

Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem.* 1989;264(33):19654-8.

Taylor EL, Megson IL, Haslett C and Rossi AG. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003;10:418-430.

Thomae KR, Geller DA, Billiar TR, Davies P, Pitt BR, Simmons RL, and Nakayama DK. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase muscle cells in culture. *Surgery.* 1993;114:272-277.

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

Tibério IFLC, Leick-Maldonado EA, Miyamara L, Kasahara DI, Spilborghs GMGT, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinins on airway and alveolar eosinophil recruitment. *Exp Lung Res.* 2003;29:167-77.

Tiddens H, Silverman M, Bush A. The Role of Inflammation in Airway Disease Remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:S7–S10.

Tulic MK and Hamid Q. Contribution of the Distal Lung to the Pathologic and Physiologic Changes in Asthma: Potential Therapeutic Target. *Chest*. 2003;123;348-355.

Varner AE, Lemanske RF Jr. The early and late response to allergen. In Busse WW, Holgate ST, *Asthma and rhinitis*. 2nd ed. London: Blackwell Science. 2000:1172-85.

Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, Bellia V, Bousquet J, Bonsignore G. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998b;157(2):505-11.

Vignola AM, Gagliardo R, Siena A, Chiappara G, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G. Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1(2):108-15.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G et al. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003a;123:S417-422.

Vignola AM, Bonanno A, Profita M, Riccobono L, Scichilone N, Spatafora M, Bousquet J, Bonsignore G, Bellia V. Effect of age and asthma duration upon elastase and alpha1-antitrypsin levels in adult asthmatics. *Eur Respir J*. 2003b;22(5):795-801.

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

Von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:9-10.

Wagner EM, Liu MC, Weinmann GG, et al. Peripheral lung resistance in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:584–588.

Wagner EM, Bleecker ER, Permutt S, et al. Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:447–452.

Warner RL, Paine R, Christensen PJ, Marletta MA, Richards MK, Wilconsen SE and Ward PA. Lung sources and cytokine requirements for in vivo expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12:649-661.

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

Watanabe M, Kakuta F. Expression and localization of the inducible isoform of nitric oxide synthase in polyps [abstract]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho.* 2002;105(8):873-81.

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

Watkins DN, Peroni DJ, Basclain KA, Garlepp MJ and Thompson PJ. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:629–639.

Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organ. *Lab Invest.* 1963;12:31-55.

Widdicombe JG. Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;58:S171–S175.

Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:255-81.

Wong GK, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(1):215-20.

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.

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

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

Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992;256:225-8.

Xiong Y, Karupiah G, Hogan S, Foster PS, and Ramsay AJ. Inhibition of allergic airway inflammation in mice lacking nitric oxide synthase 2. *J Immunol.* 1999;162:445–452.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA,

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

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

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

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

Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):253-62.