

JULIANA MORELLI LOPES GONÇALVES JOÃO

Efeito dos inibidores de protease de plantas em comparação com corticosteroide na inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em um modelo de Sobreposição Asma-DPOC (ACO)

**São Paulo
2023**

JULIANA MORELLI LOPES GONÇALVES JOÃO

Efeito dos inibidores de protease de plantas em comparação com corticosteroide na inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em um modelo de Sobreposição Asma-DPOC (ACO)

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

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

Orientadora: Dra. Edna Aparecida Leick

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

João, Juliana Morelli Lopes Gonçalves
Efeito dos inibidores de protease de plantas em
comparação com corticosteroide na inflamação,
remodelamento e estresse oxidativo em um modelo de
Sobreposição Asma-DPOC (ACO) / Juliana Morelli Lopes
Gonçalves João. -- São Paulo, 2023.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.
Orientadora: Edna Aparecida Leick.

Descritores: 1.Síndrome de sobreposição da doença
pulmonar obstrutiva crônica e asma 2.Inflamação
3.Inibidores de serino protease 4.Estresse
oxidativo 5.Dexametasona

USP/FM/DBD-063/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

DEDICATÓRIA

Ao meu alicerce, meu refúgio, minha família: Ana Claudia, Gustavo, Maria Aparecida
Elizabeth, Fernando José, Fabiana Maria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e Nossa senhora, que de alguma forma abençoou essa trajetória e esse projeto.

Agradeço à minha orientadora Dr^a Edna Leick, Edninha, pelos ensinamentos, amor à pesquisa, orientação e paciência. Por compartilhar generosamente todo o seu conhecimento, experiência e por sempre estar com o coração aberto para me receber seja com apoio científico ou pelos conselhos e palavras que foram tão necessárias. Sua humanidade, ética, humildade e companheirismo auxiliaram no meu crescimento profissional e pessoal, sou muito grata, principalmente por fazer o papel de porto seguro nessa fase tão importante.

Minha enorme gratidão à Dr^a Iolanda Tibério, que sempre se mostrou presente e necessária. Sempre compartilhando, acreditando e impulsionando para a concretização desse lindo trabalho. Sua força e seu amor pela pesquisa se fazem presente no coração de todos que trabalham no laboratório, junto com sua delicadeza e carinho para com todos.

Ao Dr. Renato Righetti, que sempre acreditou no meu trabalho, desde a preceptoria minha total admiração pelo seu trabalho bem como sua maneira de ensinar, sendo tão zeloso com os alunos e com sua forma de passar conhecimento e vivências. Espero levar seu exemplo de ensino na minha trajetória como mestre.

Às minhas companheiras de trabalho, e agora amigas, Jéssica Anastácia e Luana Salles por terem me dado apoio nos momentos difíceis no qual passamos, por dividir tantos sentimentos nessa longa jornada. Sou muito grata por dividir essa trajetória com vocês.

À Dr^a. Carla Prado, ao Dr. Francisco Soriano e à Dr^a. Clarice Olivo, pelas correções no exame de qualificação.

À Profa. Dr^a Maria Luiza Oliva e à Dr^a Camila Bonturi, pela disponibilização dos peptídeos e apoio técnico e teórico, sempre muito presente em toda minha trajetória.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

processo número 2018/02537-5, pelo apoio financeiro.

À equipe do LIM-20 e da pós-graduação pelo apoio e parceria: Silvia Fukuzaki, Suellen Bezerra, Leandro Camargo, Elaine Campos, Davi Francisco Ferreira e Rosana Reis Vilela.

Aos meus amigos do Centro de Reabilitação do Hospital Sírio Libanês e à minha chefia Maria Rita e Wellington por me apoiarem nessa jornada com incentivos e carinho, sempre acreditando no meu potencial.

Aos meus avós, Fernando José e Maria Aparecida Elizabeth, que são minha vida, meu exemplo de amor e alicerce. Com carinho e palavras de apoio me fizeram chegar até aqui.

Ao meu maior exemplo de vida, minha mãe Ana Claudia, que sempre me incentivou a buscar meus sonhos e objetivos e com seu amor incondicional me mostrou o quanto somos capazes de vencer. Essa vitória é sua.

À minha madrinha Fabiana, que com seu amor me trouxe colo e aconchego nos momentos mais necessários, acreditando e me incentivando a buscar meu crescimento e minha força.

Ao meu eterno namorado e hoje marido, Gustavo, meu parceiro de vida, meu amor e o maior incentivador das minhas conquistas. Caminharemos sempre juntos, sempre incentivando e concretizando nossos sonhos.

RESUMO

João JMLG. Efeito dos inibidores de protease de plantas em comparação com corticosteroide na inflamação, remodelamento e estresse oxidativo em um modelo de Sobreposição Asma-DPOC (ACO) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: Os doentes com Sobreposição de Asma-DPOC (ACO) apresentam piores sintomas respiratórios e qualidade de vida, maior número de hospitalizações, com má resposta ao tratamento padrão-ouro do que os doentes com asma ou DPOC. Os peptídeos derivados de *Enterolobium contortisiliquum* (Pep-3-EcTI) ou da sequência primária de um inibidor de caliceína isolado de *Bauhinia bauhinioides* (Pep-BbKI) e um peptídeo derivado de *Bauhinia rufa* (Pep-BrTI) possuem atividades anti-inflamatória e antioxidante representando um tratamento potencial para ACO.

Objetivo: Investigar os efeitos dos peptídeos Pep-3-EcTI, Pep-BbKI e Pep-BrTI em comparação ao tratamento com dexametasona (DX) em um modelo ACO. **Métodos:** Camundongos foram pré-tratados com: OVA (ovalbumina), ELA (elastase), ACO (OVA+ELA), ACO-Pep-3-EcTI (OVA+ELA+Pep-3-EcTI), ACO-Pep-BbKI (OVA+ELA+Pep-BbKI), ACO-Pep-BrTI (OVA+ELA+Pep-BrTI), ACO-DX (OVA+ELA+DX) juntamente com controles não tratados (SAL- salina) e hiperresponsividade à metacolina, níveis de óxido nítrico exalado (NOex), intercepto linear médio (Lm), contagem de células imunes no líquido de lavagem broncoalveolar (FLBA), bem como expressão de citocinas, remodelação da matriz extracelular e estresse oxidativo nas vias aéreas (VA) e septos alveolares (SA) foram avaliados em tecido pulmonar. Usamos a análise de variância (ANOVA) de uma via para estatísticas ($p < 0,05$).

Resultados: Houve aumento da Resistência do Sistema Respiratório (%Rrs), Resistência das Vias Aéreas (%Raw), Resistência do Tecido Pulmonar (%Gtis), NOex, Lm, células totais, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , MMP-9, MMP-12, TGF- β , fibras de colágeno no ACO em comparação com OVA e ELA ($p < 0,05$). Após o tratamento com peptídeos ou dexametasona, houve atenuação ou reversão de todas as respostas em relação ao grupo ACO ($p < 0,05$). O ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI e ACO-Pep-BrTI inverteram as mudanças no modelo (sendo diferente do ACO e igual ao SAL), em: %Rrs, %Raw, %Gtis, NOex, Lm, IL-1 β (SA), IL-5(VA/SA), IL-6(SA), IL-10(VA/SA), IL-13(SA), IL-17(VA/SA), IFN- γ (VA), TNF- α (SA), MMP-9(VA/SA), MMP-12(SA), fibras de colágeno(VA/SA) ($p < 0,05$). O tratamento com peptídeos atenuou as mudanças no modelo (sendo diferente do ACO e diferente do SAL, também) na análise de: células totais, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, IL-1 β (VA), IL-6(SA), IL-13(VA), IL-17(SA), MMP-9(VA/SA), MMP-12(VA), TGF- β (VA/SA), iNOS(VA/SA), NF-KappaB (VA/SA). ACO-DX reverteu as alterações em relação a ACO para: %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, Lm, células totais e células diferenciais, IL-1 β (VA/SA), IL-4(SA), IL-5(VA/SA), IL-6(VA/SA), IL-10(VA/SA), IL-13(VA/SA), IFN- γ (VA/SA), TNF- α (VA/SA), MMP-9(VA/SA), MMP-12(VA/SA), TGF- β (VA/SA), fibras colágenas (VA/SA), iNOS e NOex ($p < 0,05$). O SAL foi semelhante aos três grupos SAL-Peptídeos ($p < 0,05$), portanto usamos apenas SAL como grupo controle.

Conclusão: Esses peptídeos foram comparáveis aos corticosteroides no controle da hiper-responsividade, inflamação, remodelamento, marcadores de estresse oxidativo e interceptação linear médio neste modelo de ACO, sugerindo que estudos adicionais usando esses peptídeos em um estabelecimento de tratamento seriam valiosos.

Palavras-chave: Síndrome de sobreposição da doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. Inflamação. Inibidores de serino protease. Estresse oxidativo. Dexametasona.

ABSTRACT

João JMLG. Effect of plant protease inhibitors versus corticosteroid on inflammation, remodeling and oxidative stress in an Asthma-COPD Overlap model (ACO) [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Background: Patients with Asthma-COPD Overlap (ACO) have worse respiratory symptoms and quality of life, more hospitalizations, with poor response to the gold standard treatment than patients with asthma or COPD. The peptides derived from *Enterolobium contortisiliquum* (Pep-3-EcTI) or from the primary sequence of a kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* (Pep-BbKI) and a derived peptide from *Bauhinia rufa* (Pep-BrTI) have anti-inflammatory and antioxidant activities representing a potential treatment for ACO. **Objective:** To investigate the effects of peptides Pep-3-EcTI, Pep-BbKI and Pep-BrTI compared to dexamethasone (DX) treatment in an ACO model. **Methods:** Mice were pre-treated with: OVA (ovalbumin), ELA (elastase), ACO (OVA+ELA), ACO-Pep-3-EcTI (OVA+ELA+Pep-3-EcTI), ACO-Pep-BbKI (OVA+ELA+Pep-BbKI), ACO-Pep-BrTI (OVA+ELA+Pep-BrTI), ACO-DX (OVA+ELA+DX) alongside with non-treated controls (SAL-saline) and hyperresponsiveness to methacholine, levels of exhaled nitric oxide (eNO), linear mean intercept (Lm), immune cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) as well as cytokines expression, extracellular matrix remodeling and oxidative stress in airways (AW) and alveolar septa (AS) were evaluated in lung tissue. We used *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) for statistics ($p < 0.05$). **Results:** There was an increase in Respiratory System Resistance (%Rrs), Airway Resistance (%Raw), Lung Tissue Resistance (%Gtis), eNO, Lm, total cells, eosinophils, macrophages, neutrophils, IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , MMP-9, MMP-12, TGF- β , collagen fibers in the ACO compared with OVA and ELA ($p < 0.05$). After treatment with peptides or dexamethasone, there was attenuation or reversion of all responses compared to the ACO group ($p < 0.05$). The ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI and ACO-Pep-BrTI reversed changes in the model (being different from ACO and equal to SAL, in: %Rrs, %Raw, %Gtis, eNO, Lm, IL-1 β (AS), IL-5(AW/AS), IL-6(AS), IL-10(AW/AS), IL-13(AS), IL-17(AW/AS), IFN- γ (AW), TNF- α (AS), MMP-9(AW/AS), MMP-12(AS), collagen fibers(AW/AS) ($p < 0.05$). The treatment with peptides attenuated the changes in the model (being different from ACO and different from SAL, as well) in the analysis of: total cells, eosinophils, macrophages, neutrophils, IL-1 β (AW), IL-6(AS), IL-13(AW), IL-17(AS), MMP-9(AW/AS), MMP-12(AW), TGF- β (AW/AS), iNOS(AW/AS), NF-KappaB(AW/AS). ACO-DX reversed the changes in relation to ACO for: %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, Lm, total cells and differential cells, IL-1 β (AW/AS), IL-4(AS), IL- γ 5(AW/AS), IL-6(AW/AS), IL-10(AW/AS), IL-13(AW/AS), IFN- γ (AW/AS), TNF- α (AW/AS), MMP-9(AW/AS), MMP-12(AW/AS), TGF- β (AW/AS), collagen fibers(AW/AS), iNOS and eNO ($p < 0.05$). SAL was similar to the three SAL-Peptides groups ($p < 0.05$); hence we used only SAL as a control group. **Conclusion:** These peptides were comparable to corticosteroids in controlling hyperresponsiveness, inflammation, remodeling, oxidative stress markers and mean linear intercept in this ACO model, suggesting that further studies using these peptides in a treatment establishment would be worthwhile.

Keywords: Asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. Inflammation. Serine protease inhibitors. Oxidative stress. Dexamethasone.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO:	Sobreposição Asma-Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
FLBA:	Fluido do Lavado Broncoalveolar
BbCI:	<i>Bauhinia bauhinioides Cruzipain Inhibitor</i>
BbKI:	<i>Bauhinia bauhinioides Kallikrein Inhibitor</i>
BrTI:	<i>Bauhinia rufa</i> (Kunitz-type trypsin inhibitor)
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CID10:	Classificação Internacional das Doenças
CrataBL:	<i>Crataeva tapia Bark Lectin</i>
CVC:	Capacidade Vital Forçada
Da:	Daltons
DAB:	Diaminobenzidina
DPOC:	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DX:	Dexametasona
EcTI:	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>
EGF:	Fator de crescimento epidérmico
ELA:	Elastase
ENO:	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPP:	Elastase Pancreática Porcina
EPS:	Elastase Pancreática Suína
ERN:	Espécies Reativas Nitrogenadas
ERO:	Espécies Reativas de Oxigênio
Ers:	Elastância do Sistema Respiratório
FGF:	Fator de Crescimento Fibroblástico
GINA:	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GOLD:	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
Gtis:	Resistência do Tecido Pulmonar
HDAC2:	Histona Desacetilase-2
Htis:	Elastância do Tecido Pulmonar
HuPK:	Caliceína Plasmática Humana
IFN- γ :	Interferon Gama

IgE:	Imunoglobulina E
IL:	Interleucina
iNOS:	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IPs:	Inibidores de Protease
I.P:	Intraperitoneal
I.T:	Intratraqueal
Lm:	Intercepto Linear Médio
LTB4:	Leucotrieno B4
MEC:	Matriz Extracelular
MMP:	Metaloprotease de Matriz
mMRC:	Conselho de Pesquisa Britânico Modificado
NaCl:	Cloreto de Sódio
NANC:	Neurotransmissor Endógeno Não Adrenérgico e Não Colinérgico
NIH:	<i>National Institute of Health</i>
NFKappaB:	Fator Nuclear KappaB
nNOS:	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO:	Óxido Nítrico
NOS:	Óxido Nítrico Sintase
NOex:	Óxido Nítrico exalado
Nrf2:	Fator Nuclear Eritroide 2
OVA:	Ovoalbumina
OMS:	Organização Mundial da Saúde
OCS:	Corticosteroides Orais
PBS:	Solução Tampão Salina
<i>Pep-3-EcTI:</i>	Peptídeo EcTI
<i>Pep-BbKI:</i>	Peptídeo BbKI
<i>Pep-BrTI:</i>	Peptídeo BrTI
Ptr:	Pressão traqueal
PMN:	Células Polimorfonucleares
Raw:	Resistência das Vias Aéreas Superiores
Rrs:	Resistência do Sistema Respiratório
SUS:	Sistema Único de Saúde
SF:	Soro Fisiológico
T:	Tempo

Th:	Célula T Auxiliadora
TGF- β :	Fator Transformador de Crescimento Beta
TIMP:	Inibidor Tecidual da Metaloprotease
TNF- α :	Fator de Necrose Tumoral Alfa
V':	Fluxo Aéreo
V:	Volume Pulmonar
VEF1:	Volume Expiratório Forçado ao Final do Primeiro Segundo

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Definições de Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	1
1.2 Epidemiologia Asma e DPOC	3
1.3 Fisiopatologia da Asma	4
1.4 Fisiopatologia da DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)	7
1.5 Remodelamento da Matriz Extracelular na ASMA e DPOC	9
1.6 Estresse Oxidativo na Asma e DPOC	11
1.7 Asma - DPOC: ACO	14
1.8 Epidemiologia e Fisiopatologia da ACO	14
1.9 Inibidores de Proteases de Origem Vegetal (ou Vegetais)	16
Justificativa para o Estudo	23
2 OBJETIVOS	25

2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Material Vegetal	27
3.2.1 Peptídeo Sintético	27
3.3 Grupos Experimentais	28
3.4 Modelo Experimental de Asma	29
3.5 Modelo Experimental do Enfisema	29
3.6 Modelo Experimental de ACO	29
3.7 Tratamento com os Peptídeos (<i>Pep-3-EcTI</i>, <i>Pep-BbKI</i>, <i>Pep-BrTI</i>)	30
3.8 Tratamento com Dexametasona	30
3.9 Avaliações da Mecânica Pulmonar e Coleta de Óxido Nítrico Exalado (NOex)	31
3.10 Coleta e Análise do Fluído do Lavado Broncoalveolar (FLBA)	33
3.11 Histologia e Imuno-Histoquímica	34
3.11.1 Avaliação das Imagens para Medida de Densidade Óptica	34
3.11.2 Quantificação de Fração de Volume de Fibras Colágenas	35
3.11.3 Avaliação Imuno-Histoquímica	36
3.11.4 Análise Morfométrica	38
3.11.5 Avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm)	39

3.12 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Comparação dos Grupos Controles	41
4.2 Hiperresponsividade à Metacolina	44
4.2.1 Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)	44
4.2.2 Elastância do Sistema Respiratório (Ers)	45
4.2.3 Resistência das Vias Aéreas (Raw)	46
4.2.4 Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)	47
4.2.5 Elastância do Tecido Pulmonar (Htis)	48
4.3 Intercepto Linear Médio (Lm)	49
4.4 Medida do Óxido Nítrico Exalado (NOex)	50
4.5 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)	51
4.5.1 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar - Células Diferenciais	51
4.5.2 Neutrófilos	52
4.5.3 Eosinófilos	53
4.5.4 Macrófagos	54
4.5.5 Linfócitos	55
4.6 Marcadores Inflamatórios	56
4.6.1 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-1 β nas Vias Aéreas	56
4.6.2 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-1 β nos Septos Alveolares	57
4.6.3 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-4 nas Vias Aéreas	58
4.6.4 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-4 nos Septos Alveolares	59
4.6.5 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-5 nas Vias Aéreas	60
4.6.6 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-5 nos Septos Alveolares	61
4.6.7 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-6 nas Vias Aéreas	62
4.6.8 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-6 nos Septos Alveolares	63
4.6.9 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-10 nas Vias Aéreas	64
4.6.10 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-10 nos Septos Alveolares	65
4.6.11 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-13 nas Vias Aéreas	66
4.6.12 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-13 nos Septos Alveolares	67
4.6.13 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-17 nas Vias Aéreas	68
4.6.14 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-17 nos Septos Alveolares	69

4.6.15 Avaliação do Número de Células Positivas para IFN- γ nas Vias Aéreas	70
4.6.16 Avaliação do Número de Células Positivas para IFN- γ nos Septos Alveolares	71
4.6.17 Avaliação do Número de Células Positivas para TNF- α nas Vias Aéreas	72
4.6.18 Avaliação do Número de Células Positivas para TNF- α nos Septos Alveolares	73
4.8 Marcadores de Remodelamento	74
4.8.1 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-9 nas Vias Aéreas	74
4.8.2 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-9 nos Septos Alveolares	75
4.8.3 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-12 nas Vias Aéreas	76
4.8.4 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-12 nos Septos Alveolares	77
4.8.5 Avaliação do Número de Células Positivas para TGF- β nas Vias Aéreas	78
4.8.6 Avaliação do Número de Células Positivas para TGF- β nos Septos Alveolares	79
4.8.7 Avaliação da Porcentagem de Fibras Colágenas nas Vias Aéreas	80
4.8.8 Avaliação da Porcentagem de Fibras Colágenas nos Septos Alveolares	81
4.9 Marcadores do Estresse Oxidativo	82
4.9.1 Avaliação do Número de Células Positivas para iNOS nas Vias Aéreas	82
4.9.2 Avaliação do Número de Células Positivas para iNOS nos Septos Alveolares	83
4.10 Fator de Transcrição	84
4.10.1 Avaliação do Número de Células Positivas para NF-KappaB nas Vias Aéreas	84
4.10.2 Avaliação do Número de Células Positivas para NF-KappaB nos Septos Alveolares	85
4.11 Análise Qualitativa	86
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÃO	100
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definições de Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A asma é uma doença multifatorial, heterogênea que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo, ocasionando aumento dos custos de saúde pública, pressionando o sistema de saúde e conseqüentemente a sociedade (GINA, 2022).

Sendo uma doença heterogênea, inflamatória e crônica das vias aéreas, a história natural da asma, inclui episódios recorrentes de falta de ar, chiado, tosse e sensação de aperto no peito, variando a intensidade ao longo do tempo dependendo da limitação variável do fluxo expiratório. Além disso, a limitação do fluxo expiratório pode tornar-se persistente ao longo do tempo (GINA, 2022).

Tendo como acometimento todas as faixas etárias e sofrendo influências genéticas e ambientais, a asma pode se agravar. Assim, à medida em que ela fica mais grave, as vias aéreas do paciente ficam mais suscetíveis a fatores como alérgenos biologicamente ativos, vírus, poluentes do ar, medicamentos, produtos químicos, o que leva a uma resposta de reparo alterada, incluindo mudanças estruturais que podem estar associadas a sintomas persistentes e diminuição da função pulmonar (Holgate, 2012).

Essa combinação dos diferentes processos auxilia no entendimento sobre os diferentes fenótipos de asma, bem como sua história e a resposta frente ao tratamento (Lemanske, Busse, 2010; Holgate, 2012).

A hiper-responsividade, segundo a *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2022), é a principal responsável pelos recorrentes episódios de sibilos, dispneia, tiragem intercostal e tosse, particularmente no período noturno e início da manhã; alguns estudos mostram correlação com o ciclo circadiano e os hormônios como cortisol que estão ligados à via aérea. Estes sintomas e limitação do fluxo aéreo variam com o tempo e intensidade, sendo que estas variações dependem do fator que os desencadeiam, como exercício, exposição a um alérgeno, mudança no tempo, infecção por vírus respiratório.

A DPOC é a terceira principal causa de morte em todo o mundo, sendo que 90% dessas mortes ocorrem em países de baixa e média renda. No ano de 2012, mais de 3 milhões de pessoas morreram de DPOC, sendo responsável por 6% de

todas as mortes no mundo. A DPOC representa um importante desafio de saúde pública e ela pode ser prevenida e também é tratável. A DPOC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade crônicas em todo o mundo. Muitos pacientes que sofrem desta doença acabam morrendo prematuramente dela ou de suas complicações. Globalmente, a carga da DPOC é projetada para aumentar nas próximas décadas, devido à exposição continuada aos fatores de risco da DPOC e ao envelhecimento da população (GOLD, 2022).

Caracterizada com obstrução do fluxo aéreo progressiva e ocasionada pela inalação de partículas e gases tóxicos, tem no tabagismo sua causa principal. O processo inflamatório crônico pode produzir alterações nos brônquios, causando bronquite crônica com alterações nos bronquíolos de característica obstrutiva, com disfunção em parênquima pulmonar, resultando em características de enfisema pulmonar. Assim, essas alterações nem sempre acontecem juntas, mas evoluem em níveis diferentes ao longo do tempo (GOLD, 2022).

A inflamação crônica leva à mudança estrutural pulmonar. A perda do parênquima pulmonar e estreitamento das pequenas vias aéreas levam a dano na comunicação dos alvéolos às pequenas vias aéreas, o que diminui o recuo elástico do pulmão (GOLD, 2022).

A anamnese, exame clínico e dados espirométricos são importantes para obter o diagnóstico da DPOC. Os sintomas podem ser dispneia persistente e progressiva, tosse crônica intermitente nem sempre produtiva, mas que piora com esforço físico, e conter histórico de exposição aos fatores de risco, como o tabagismo (GOLD, 2022).

Sendo a espirometria o exame complementar para o diagnóstico da DPOC, a obstrução se dá quando a relação entre o Volume Expiratório Forçado no 1 segundo (VEF1) e a Capacidade Vital Forçada (CVF) resultam em um valor menor que 0,70. Também é necessária uma radiografia de tórax para descartar outros diagnósticos (GOLD, 2022).

Tanto a asma como a DPOC são doenças amplamente estudadas, com fisiopatologia e diagnósticos bem definidos. No entanto, tem-se estudado, nos últimos anos, a Sobreposição Asma-DPOC (ACO), que se baseia na sobreposição de características comuns a ambas as doenças e apresenta manifestações clínicas semelhantes (GINA, 2022).

1.2 Epidemiologia Asma e DPOC

Segundo dados coletados do *DATASUS*, no ano de 2019, cerca de 119.465 óbitos em adultos foram computados por local de internação conforme a classificação internacional das doenças (CID-10), com asma e doenças do espectro obstrutivo e suas variantes (*DATASUS*, 2020).

A crescente urbanização da população mundial, vem aumentando a prevalência da asma a cada ano, variando entre 1–18% da população nos diferentes países (*GINA*, 2022).

A prevalência da DPOC, varia nas regiões do mundo, mas estima-se que em 2010 houve cerca de 384 milhões de casos, com prevalência global de 11,7%, sendo que mundialmente, estima-se que cerca de 3 milhões de mortes anuais ocorrem por conta dessa patologia, sendo a terceira causa de morte e a quinta causa de incapacidade crônica (*GBD*, 2020; *GOLD*, 2022). Cerca de 10% da população mundial acima de 40 anos é afetada por essa patologia e esse número tem aumento principalmente em países de média e baixa renda a medida do envelhecimento populacional (*GBD*, 2020). Com o aumento da prevalência do tabagismo em países desenvolvidos e aumento da expectativa de vida, acredita-se que nos próximos 40 anos haverá mais de 5,4 milhões de mortes por DPOC anualmente (*GOLD*, 2022).

Em geral, os estudos que estão sendo realizados indicam que a asma bem controlada não apresenta risco aumentado de morte relacionada ao coronavírus COVID-19. Porém, o risco de morte por COVID-19 foi aumentado em pessoas que recentemente precisaram de corticosteroides orais (OCS) para a asma e em pacientes hospitalizados com asma grave (*GINA*, 2022).

De janeiro de 2020 até outubro do mesmo ano, comparativamente, cerca de 66.335 mortes foram atribuídas a esse grupo de doenças em pacientes adultos internados, visto que 2020 foi um ano de pandemia do Coronavírus, Covid-19. Se o paciente tem asma ou DPOC e evolui a óbito por Covid-19 é notificado pelo Covid-19, o que pode explicar a diminuição de óbitos por internação em comparação a 2019 (*DATASUS*, 2020).

1.3 Fisiopatologia da Asma

A sensibilização, processo inicial para o desenvolvimento da asma, ocorre quando as células dendríticas presentes no epitélio brônquico são ativadas, agindo como apresentadoras de antígeno. A ativação resulta em uma cascata de eventos, que culmina em produção de citocinas que atraem neutrófilos, monócitos e células dendríticas para as vias aéreas. Também ocorre a transformação de linfócitos T CD4+ em células de perfil T auxiliadora (Th)2. Logo em seguida, quando ativada, a célula Th2 apresenta a diferenciação linfocitária, ocorrendo uma resposta de perfil de citocinas Th2, além de estimular a produção de anticorpos imunoglobulina E (IgE), contribuindo para a lesão e inflamação observada na asma (Krystel-Whittemore et al., 2015; Santos et al., 2018).

Após a fase de sensibilização, em um segundo contato, há o desencadeamento de dois tipos de resposta: imediata e tardia. A reação imediata ocorre após a ativação das células que liberam a IgE, caracterizada pela ativação de mastócitos e macrófagos das vias aéreas, que ocorre de maneira rápida. As células ativas liberam mediadores que induzem a contração da musculatura lisa das vias aéreas, liberando mediadores inflamatórios como histamina, prostaglandinas e cisteinil-leucotrienos (Bousquet *et al.*, 2000; Holgate, 2000; Lemanske; Busse, 2010).

Esses mediadores podem comprometer a integridade epitelial, pois induzem à contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudato de plasma. Como ilustrado na *Figura 1* adaptada de *Robbins e Cotran Pathologic Basis of Disease*, (2010). A reação tardia envolve o recrutamento e ativação de eosinófilos, células T CD4+, basófilos, neutrófilos e macrófagos para as vias aéreas. Ela ocorre entre 6 a 9 horas após o contato com o antígeno, podendo prosseguir por dias. É caracterizada por persistência das alterações presentes na reação imediata e aumento da hiper-responsividade brônquica, ocasionando o processo de remodelamento tecidual (Ito et al., 2019).

Os macrófagos produzem citocinas, elastase, metaloproteases e proteases, que degradam componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios ocasionando a potencialização da agressão tecidual e a formação de tecido cicatricial (Barnig et al., 2018).

Os mastócitos, por sua vez, contêm proteoglicanos e podem contribuir com a resposta inflamatória pela liberação de diversas citocinas inflamatórias, como: IL-4, IL-

5, histaminas, cisteinil-leucotrienos, prostaglandinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento fibroblástico (FGF), citocinas que acarretam na proliferação fibroblástica e têm como função atuar na digestão da matriz extra celular. Um dos sintomas da asma, a secreção de muco está relacionada com a degranulação de mastócitos, onde existe relação entre inflamação das vias aéreas, obstrução do muco e gravidade da doença (Cruse e Bradding, 2015; Gao e Jacobson, 2017).

Os eosinófilos são característicos da inflamação alérgica desencadeando alteração vascular, hipersecreção de muco, desprendimento epitelial, aumento da hiper-responsividade das vias aéreas e obstrução ao fluxo aéreo. Quando ativados liberam leucotrienos (produtos do metabolismo oxidativo) e outras substâncias, como fatores de crescimento e metaloproteases, envolvidos no remodelamento das vias aéreas (Leick-Maldonado et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010; Possa et al., 2013).

Os linfócitos T, da linhagem Th2, são importantes no curso da inflamação, com o objetivo de controlar e perpetuar a inflamação e remodelamento por intermédio de citocinas específicas. Quando ativadas, a célula T auxiliadora Th2 liberam interleucinas, como interleucinas (IL): IL-4, IL-5 e IL-13, levando à proliferação de células Th2, interferon-gama (IFN- γ) e IL-2, ocasionam a proliferação de células T auxiliadora Th1, fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e IL-6 que induzem a proliferação de células Th17 (Ito et al., 2019).

Muitas citocinas identificadas na fisiopatologia da asma apresentam sobreposição de funções, sendo difícil diferenciar o papel de cada uma na patogênese da asma e das doenças alérgicas. Podemos classificá-las em: 1) Linfocinas: secretadas por células T e que regulam a resposta imunológica; 2) Citocinas de predomínio pró-inflamatório: amplificam e perpetuam o processo inflamatório; 3) Fatores de crescimento: promovem a sobrevivência de células, resultando em mudanças estruturais nas vias aéreas; 4) Quimiocinas: são citocinas quimiotáticas para o processo inflamatório; 5) Citocinas anti-inflamatórias: diminuem a resposta inflamatória (Romagnani, 2000; Barnes, 2008).

A citocina IL-5 é importante no recrutamento de eosinófilos para a via aérea, já a IL-13 cursa com a indução da hiper-responsividade brônquica, hiperplasia de células goblet e produção de mucina (Hamid e Tulic, 2009). Essas citocinas quando liberadas podem comprometer a integridade epitelial, pois elas vão induzir a contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudação de plasma (Hawrylowicz, 2005; Galil e Tsai, 2008).

A IL-4 estimula os linfócitos a produzirem IgE, que se liga à superfície dos mastócitos. Assim, os mastócitos quando ativados, liberam alguns mediadores, como: IL-4, IL-5, histamina, leucotrienos e prostaglandinas (Bagnasco et al., 2016). A IL-4 liberada dos mastócitos tem por objetivo perpetuar a produção de IgE e conseqüentemente os eventos inflamatórios nas vias aéreas, enquanto a IL-5, especificamente, recruta eosinófilos para as vias aéreas (Hendeles et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010).

Vem-se estudando e ganhando um interesse maior sobre as células Th17 em relação à modulação de doenças crônicas e inflamação alérgica. Camargo e colaboradores (2017), documentaram maior expressão de IL-17 nos pulmões, fluido do lavado broncoalveolar e tecido pulmonar em modelo de asma. O perfil Th17 e as citocinas produzidas desempenham um papel chave no desenvolvimento da asma neutrofílica e são correlacionados com esteroides resistentes à gravidade da doença, determinantes para a asma grave. Como também, a citocina IL-17 contribui para o processo de remodelamento das vias aéreas na asma (Camargo et al., 2017).

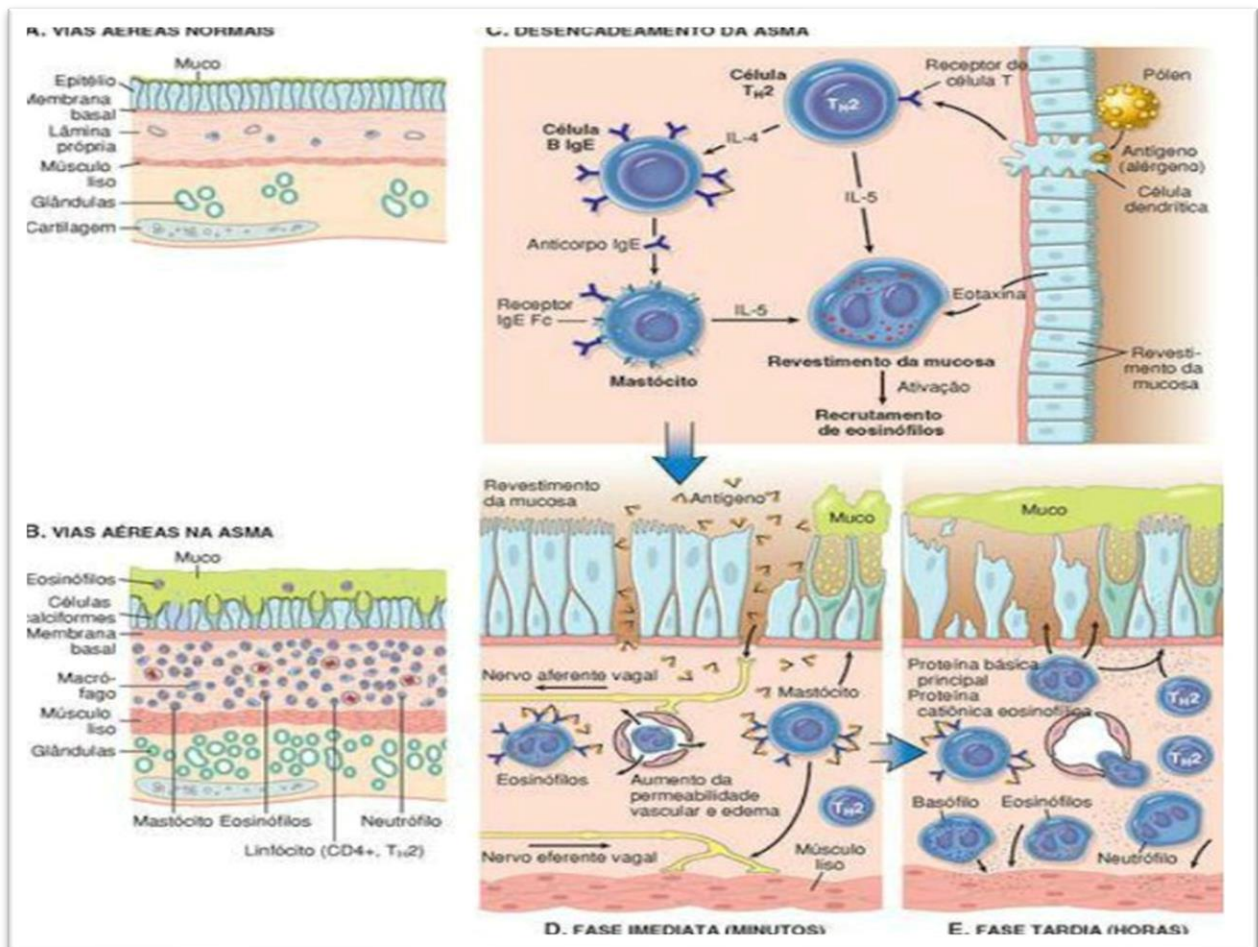


Figura 1. Fases (Imediata e tardia) envolvidas no processo fisiopatológico da asma alérgica.
Fonte:(Adaptado de *Robbins e Cotran Pathologic Basis of Disease*, 2010).

1.4 Fisiopatologia da DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)

A doença pulmonar obstrutiva crônica é caracterizada pelo processo inflamatório crônico geralmente causado por exposição significativa a partículas ou gases nocivos. Há persistência dos sintomas respiratórios, como dispneia, tosse, inatividade física, expiração prolongada, uso da musculatura acessória, hiperinsuflação e limitação do fluxo de ar e/ou anormalidades alveolares causadas por mudanças estruturais e diminuição da luz brônquica (Vogelmeier et al., 2017). Nela ocorre a destruição do parênquima pulmonar, levando à perda do acoplamento alveolar nas pequenas vias aéreas, diminuindo o recolhimento elástico do pulmão. Essas alterações ocasionam a diminuição da probabilidade das vias aéreas de se manterem abertas durante a expiração (Laperre et al., 2006).

A inflamação crônica leva a mudanças estruturais e diminuição da luz brônquica, principalmente em vias aéreas periféricas e parênquima pulmonar, sendo o processo inflamatório crônico das vias aéreas uma característica muito relevante na fisiopatologia da DPOC, levando a fibrose das pequenas vias aéreas e enfisema, que são progressivos. (Barnes, 2015; Barnes, 2017; GOLD, 2022).

Nas pequenas e grandes vias aéreas, acometidas pela inflamação crônica, encontra-se hiperplasia de células caliciformes, aumento de glândulas mucosas e infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ nas grandes vias aéreas, principalmente em fases mais avançadas. Com predomínio de macrófagos, o infiltrado inflamatório é encontrado também nas vias aéreas menores, nas fases iniciais da doença (Barnes, 2017).

Os neutrófilos são células importantes que têm como função liberar enzimas elastolíticas como a elastase, que coordena a destruição tecidual e a inflamação crônica. Em fases mais avançadas, essas células, estimuladas por proteases neutrofílicas, podem estar relacionadas à produção de muco (Churg e Wright, 2005).

Os macrófagos, presentes nas vias aéreas respiratórias distais, tanto no Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA), quanto no escarro são os mais encontrados nos pacientes com DPOC e têm papel central na patogênese da doença. Essas células são ativadas pela fumaça do cigarro e responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios, o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), quimiocinas : CXCL1, CXCL8, CCL2

e leucotrieno B4 (LTB4) e espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas, incluindo metaloprotease de matriz: MMP-2, MMP-9, MMP-12, catepsinas K, L e S, elastase neutrofílica, que atuam como mediadores e efetores de lesão pulmonar (Bourdin et al., 2009; Barnes, 2017, Eapen, et al., 2017).

A participação de proteases na fisiopatologia do enfisema é vastamente aceita (Churg e Wright, 2005). Alguns autores sugerem que as proteases das classes serino, cisteíno e metalo são provavelmente as substâncias mais envolvidas na patogênese da DPOC (Churg e Wright, 2005; Owen, 2008).

A destruição do tecido pulmonar é decorrente do desequilíbrio entre os sistemas de proteases e antiproteases, sendo o principal mecanismo para explicar a patogênese da DPOC. Evidências apoiam a hipótese que a inalação da fumaça de cigarro induz aumento no número de neutrófilos e macrófagos no trato respiratório, os quais liberam enzimas que não são totalmente inibidas pelas antiproteases, ocasionando à destruição do tecido conectivo pulmonar levando ao enfisema, como ilustrado na *Figura 2* (Churg et al., 2005; Fischer et al., 2011; GOLD, 2022).

Em pacientes com enfisema, quando as células inflamatórias estão ativadas, liberam mediadores químicos, tais como: citocinas, proteases e espécies reativas de oxigênio, que auxiliam na destruição pulmonar e na permanência da inflamação. Destacam-se entre mediadores as interleucinas 8 (IL-8), 1 β (IL-1 β) e 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento transformador (TGF- β) que são citocinas pró inflamatórias e desenvolvem um papel importante em muitos processos patológicos da DPOC (Fukusaki, 2019).

Alguns autores sugerem a participação de linfócitos na DPOC, visto que o mecanismo de atuação ainda requer melhor elucidação científica, e que eles possam estar associados à progressão de doença, junto com a interleucina 2 (IL-2), que induz a proliferação e ativação dos linfócitos.

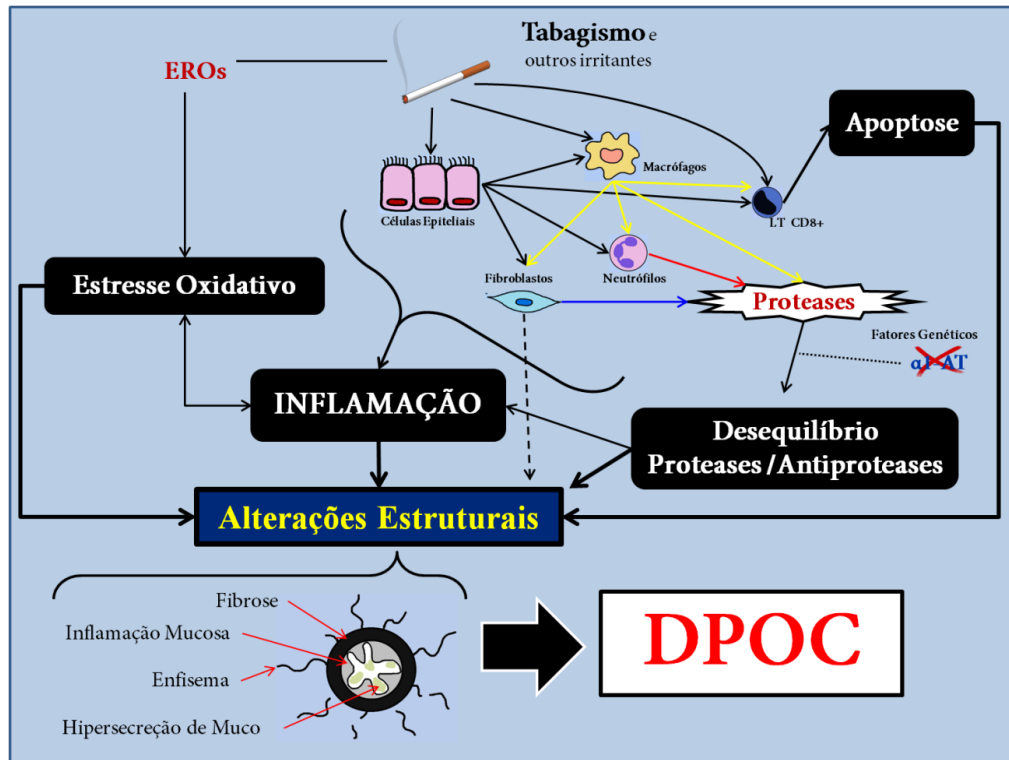


Figura 2. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DPOC representados pela interação de células inflamatórias. Irritantes como a fumaça do cigarro atuam nas células epiteliais ativando os macrófagos, que por sua vez liberam EROS (Espécies Reativas de Oxigênio). Assim, são liberados vários mediadores inflamatórios que levam a reações como aumento da inflamação, desequilíbrio protease-antiprotease, estresse oxidativo e apoptose celular, sendo esses mecanismos responsáveis pelas alterações estruturais que caracterizam a fisiopatologia da DPOC. **Fonte:** (Robertoni FSZ, 2015).

A elastase neutrofílica, proteinase 3 e catepsina G são serinoproteases armazenadas por células polimorfonucleares (PMN) e monócitos, são liberadas quando os mediadores pró-inflamatórios induzem a desgranulação, podendo causar destruição do parênquima pulmonar e a produção de muco. As cisteíno-proteases representadas pelas catepsinas S, B e L, e serino-proteases representadas pela elastase atuam para a degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. As metaloproteases representadas pelas MMP-1, 2, 9, 14 e ADAM, promovem a degradação de colágeno e elastina e aumentam a expressão epitelial de proteína mucina (MUC5) (Deshmukh, 2005).

1.5 Remodelamento da Matriz Extracelular na ASMA e DPOC

Repetidos episódios inflamatórios provocam alterações estruturais por duas ações: ativação de células inflamatórias e falta de reparo adequado à lesão crônica, ocasionando o remodelamento de vias aéreas. Esse remodelamento contribui para a não reversibilidade na obstrução ao fluxo aéreo, sendo uma das causas de alguns pacientes asmáticos e com doença pulmonar obstrutiva crônica apresentarem perda

parcial e irreversível da função respiratória com o passar dos anos (Cohn et al., 2004; James, 2005; Ito, et al., 2019).

Esse processo de remodelamento brônquico, decorrente do processo inflamatório crônico, parece ser causado pela agressão repetida ao epitélio, sendo caracterizado por aumento de: células calciformes, glândulas submucosas, número de vasos e do número de células do músculo liso. Somando-se a isso, ocorre o espessamento da membrana basal com deposição de fibras colágenas e elásticas na asma junto com a redução de fibras elásticas no parênquima pulmonar na doença pulmonar obstrutiva crônica, associado com alterações subepiteliais das proteases da matriz extracelular (Black, 2004; Hirst et al., 2004; Ito et al., 2019).

O remodelamento pulmonar é caracterizado pelo aumento da deposição de proteínas de matriz extracelular nos pulmões, sendo que a deposição dessas proteínas resulta na fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso e das glândulas submucosas, ocasionando o espessamento da parede brônquica. Os estudos sugerem que o remodelamento brônquico é dado pela liberação de fatores inflamatórios, de crescimento celular e liberação de citocinas (Johnson e Knox, 1997).

Os eosinófilos e os neutrófilos podem ter um papel fundamental por causar lesão epitelial e estimular a fibrogênese através da produção de TGF- β , citocina que regula a produção de colágeno. Além, os mastócitos podem produzir citocinas, como TNF- α , IL-4, FGF (fator de crescimento fibroblástico), que influenciam na proliferação fibroblástica e atuam na digestão da matriz extracelular. Os linfócitos possuem efeito regulatório sobre a fibrose e sobre a inflamação. Os macrófagos e os neutrófilos produzem citocinas, elastase e metaloproteases 9 e 12 (MMP-9 e MMP-12), que podem degradar componentes da matriz extracelular, além das próprias células epiteliais que liberam vários mediadores inflamatórios, potencializando a agressão tecidual e a formação do tecido cicatricial (Tillie-Leblond et al., 2005; Ito. et al., 2019).

Tanto nas vias aéreas, quanto no parênquima, a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos é uma etapa crucial no remodelamento (Possa et al., 2012; Righetti et al., 2014). O TGF- β é o fator mais potente para indução da diferenciação de miofibroblastos, sendo o aumento de sua expressão encontrado em pulmões com processo de remodelamento tecidual importante, como na asma, DPOC e fibrose pulmonar. Já os miofibroblastos expressam a α -actina, marcador de fibroblastos ativados, e são responsáveis pela produção na matriz extracelular de: fibras colágenas, laminina e fibronectina (Ito et al., 2019; Saito et al., 2019).

Quanto aos mastócitos podem produzir citocinas, como TNF- α , IL-4, Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF), que têm a função de proliferação fibroblástica e atuam na digestão da matriz extracelular. Já os linfócitos possuem efeito regulatório sobre a fibrose e sobre a inflamação. Células inflamatórias aumentadas, tais quais macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD4+ e CD8+, e fibroblastos nas vias aéreas, que são muito importantes na regulação positiva de proteases, como MMP-9 e MMP-12, levam à degradação e remodelamento dos componentes da Matrix extracelular (MEC), nas pequenas vias aéreas e no parênquima (Tillie-Leblond et al., 2005; Ito et al., 2019).

1.6 Estresse Oxidativo na Asma e DPOC

Tanto a asma quanto a DPOC possuem como característica ser uma doença inflamatória pulmonar crônica de origem e localização diversas, porém ambas estão associadas a estresse oxidativo e alterações na função dos macrófagos. Os macrófagos estão presentes em grande quantidade nas vias aéreas e são importantes para regular as respostas imunológicas. Além disso, eles são conhecidos por sua capacidade de gerar oxidantes reativos, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas nitrogenadas (ERN), que apresentam funções fisiológicas e na destruição de microorganismos. O processo de estresse oxidativo ocorre por conta do desequilíbrio entre formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, proveniente da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ ou diminuição da produção/ação dos antioxidantes endógenos (Li et al., 2003; de Groot, 2019).

A molécula de óxido nítrico (NO) é descrita como um neurotransmissor endógeno não adrenérgico e não colinérgico (NANC), em vias aéreas, responsável pela modulação do tônus no brônquio pulmonar, tônus vascular e exsudação plasmática em ambos os modelos animais e humanos (Barnes et al., 1996). A partir da L-arginina é realizada a produção da NO, com ação das óxido nítrico sintases (NOS). As enzimas NOS apresentam três isoformas, sendo duas constitutivas e uma induzida. As enzimas constitutivas são denominadas eNOS e nNOS expressas em células endoteliais ou nos neurônios (Lamas et al., 1992; Bredt et al., 1990). A forma induzida (iNOS) pode estar presente em vários tecidos e órgãos, como também no endotélio vascular (Moncada et al., 1991; Moncada e Higgs, 1993). A iNOS é muito importante, sendo responsável pela produção de quantidades nanomolares de NO e

também se encontra presente principalmente em condições patológicas (Prado et al., 2009).

O NO tem sua atuação ampla, derivado da enzima que apresenta efeitos benéficos na asma ou no DPOC. Já o NO derivado da enzima eNOS pode levar à vasodilatação das arteríolas, ocasionando extravasamento de plasma e edema. A grande quantidade de NO oriundo da enzima iNOS resulta em vasodilatação, extravasamento de plasma, aumento de secreção do muco e ativação indireta de células Th2 (Barnes et al., 1996; Prado et al., 2009).

Como ilustrado na *Figura 3*, ao fumar, o tabaco expõe os pulmões dos indivíduos a espécies reativas de oxigênio (ERO) e o contato de agentes oxidantes com a membrana celular leva à peroxidação lipídica da membrana celular responsável pela formação de uma série de compostos bioativos análogos às prostaglandinas, conhecidos como isoprostanos. O estresse oxidativo é importante na fisiopatogênese da DPOC, já que ele pode agravar a doença, ampliando a resposta inflamatória, através da ativação de NF-KappaB, que está ligado aos genes do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-8 e outras células inflamatórias. Também, o mesmo pode prejudicar a função de anti-proteases, como α 1-antitripsina e, assim, acelerar a degradação da elastina no parênquima pulmonar (Fischer et al., 2011; Barnes, 2017).

O fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), regulado pela maioria dos antioxidantes, é ativado pelo estresse oxidativo. Na DPOC, o Nrf2 não é adequadamente ativado, mesmo com os altos níveis de pressão oxidativa nos pulmões, podendo estar relacionado ao aumento da acetilação devido à diminuição da histona desacetilase-2 (HDAC2) (Barnes, 2017).

Na asma, elevados níveis de NO causam mudanças significativas nos pulmões como o desequilíbrio entre as respostas dos linfócitos Th1 e Th2 e novamente pode levar a muitos efeitos prejudiciais na função das vias aéreas, como contração da musculatura lisa, lesão epitelial, indução da hiperresponsividade de vias aéreas, hipersecreção brônquica. O aumento do estresse oxidativo está demonstrado pelo aumento das concentrações de 8-isoprostano (um produto do ácido araquidônico oxidado) nos condensados do ar exalado e aumento do etano (um produto da peroxidação lipídica) no ar expirado de pacientes asmáticos (Nadeem et al., 2014; Barnes, 2017).

Este agente causa aumento da resistência pulmonar, via estresse oxidativo, pode ser um dos mediadores da limitação ao fluxo aéreo na asma, embora outros

mediadores também exerçam esta função (Shiraki et al., 2009; Groot et al., 2019).

Assim, o aumento do estresse oxidativo está relacionado à gravidade da doença, podendo amplificar a resposta inflamatória e pode reduzir a capacidade de resposta aos corticosteroides dos pacientes asmáticos fumantes.

A proteína Rho controla uma variedade de proteínas efetoras, incluindo a Rho-quinase, permitindo que a Rho funcione como uma molécula que troca a transdução com papel na regulação de múltiplas vias biológicas e fisiológicas incluindo as que influenciam o nível de tônus do músculo liso, mudanças no citoesqueleto de actina, como a adesão celular, motilidade, migração e contração. Em uma pesquisa com o intuito de observar os efeitos da inibição da Rho-quinase no tecido pulmonar com doenças crônicas em modelo experimental, foi observado atenuação significativa do número de células positivas para iNOS e da fração de volume do conteúdo de isoprostano-8-PGF-2 α na região distal do pulmão, em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (Righetti, et al., 2014).

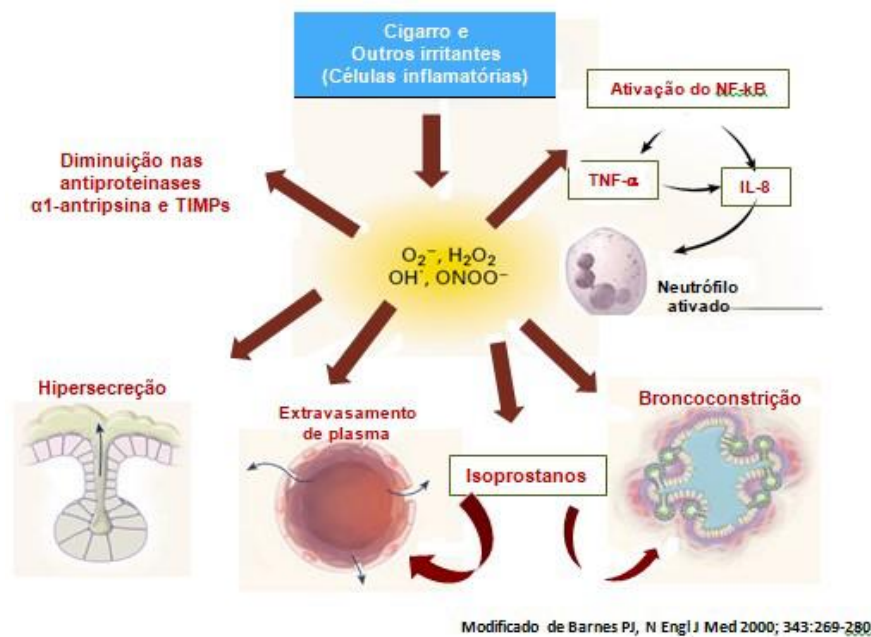


Figura 3. Fisiopatogênese do estresse oxidativo na DPOC. As espécies reativas de oxigênio decorrentes da fumaça (e outros irritantes) podem causar efeitos diversos e prejudiciais ao pulmão, tais como: diminuição de antiproteases, ativação do NF-KappaB, traduzindo em aumento de IL-8 e TNF- α . O aumento do isoprostano faz com que ocorra broncoconstrição e extravasamento de plasma. Além disso, o estresse oxidativo induz ao aumento de muco. **Fonte:** Adaptado de Barnes PJ, 2004.

1.7 Asma - DPOC: ACO

Apesar de serem distintas, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a Asma podem estar presentes em um determinado paciente, sendo denominada Sobreposição Asma-DPOC (ACO). Uma proporção significativa de pacientes com sintomas respiratórios crônicos tem diagnóstico ou características tanto de DPOC quanto de asma. Em alguns pacientes, essa sobreposição é clara, principalmente quando ocorre com pacientes com DPOC que apresentam um fenótipo particular, caracterizado por inflamação predominante do tipo 2 - eosinofílica e manifestações clínicas associadas à asma, tais como: reversibilidade significativa ao broncodilatador e aumento do número de eosinófilos no sangue e na periferia das vias aéreas, enquanto em outros, a expressão clínica da sobreposição é mais sutil. A ACO pode representar entre 10% e 40% dos pacientes com DPOC e entre 15% e 35% dos pacientes com asma (Yanagisawa e Ichinose, 2018; Mekov et al., 2021).

1.8 Epidemiologia e Fisiopatologia da ACO

A *Global Initiative for Asthma* (GINA) sugere um consenso para confirmação diagnóstica entre as três doenças sendo elas, ACO, asma e DPOC. Esta não é uma definição de uma entidade de doença única, mas um termo descritivo para uso clínico que inclui vários fenótipos clínicos que refletem diferentes mecanismos subjacentes.

Apesar de não esclarecer quantos critérios são necessários para confirmação diagnóstica, os maiores incluem espirometria, incluindo reversibilidade ao broncodilatador limitação fixa ao fluxo aéreo: Volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) / Capacidade vital forçada (CVF) <0,7 pós broncodilatador ou abaixo do limite inferior da normalidade em indivíduos com idade igual ou superior a 40 anos; carga tabagica igual ou superior a 10 maços/ano ou equivalente exposição à biomassa e história documentada de asma antes dos 40 anos de idade ou resposta ao uso de broncodilatador (400mcg de salbutamol ou equivalente) com elevação de 400 mL no VEF1. Os critérios menores incluem história documentada de atopia ou rinite alérgica; resposta ao uso de broncodilatador de elevação de 200mL e de 12% no VEF1 acima da linha de base em duas ou mais visitas e contagem de eosinófilos periféricos igual ou superior a 300 células/ μ L (GINA-GOLD, 2022).

Esses pacientes apresentam limitação crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível com o uso de broncodilatador. Pacientes com esse diagnóstico

(ACO) são mais propensos a ter exacerbações, tendendo a apresentar hipóxia grave devido à obstrução irreversível das vias aéreas e capacidade de difusão alveolar prejudicada por alterações enfisematosas. Isso tem um impacto importante na morbimortalidade, resultando em uma redução significativa na qualidade de vida desses pacientes (Yanagisawa e Ichinose, 2018; GINA, 2022; GOLD, 2022).

Assim, a ACO é uma doença das vias aéreas caracterizada por obstrução fixa ao fluxo aéreo, com características comuns tanto à asma quanto à DPOC, pois na prática clínica é identificada pelas características que compartilha com a asma e a DPOC (GINA, 2022).

Pacientes com características de ACO têm maior carga de sintomas e incapacidade física, levando a mais hospitalizações, pior qualidade de vida e aumento da mortalidade em comparação com pacientes com asma ou DPOC isoladamente (Woodruff et al., 2017; GINA, 2022).

Devido à falta de uma definição clara e ainda pouco fundamentada, a prevalência estimada de sobreposição parece variar de acordo com a população estudada e as definições utilizadas, mas foi estimada entre 15% e 55% da população, com variação por sexo e idade (GINA, 2022).

Durante a última década, houve várias definições de ACO. A maioria dessas definições reconhece que existem indivíduos com DPOC relacionada ao tabagismo com história de inflamação T2 (eosinofílica) expressa como contagem aumentada de eosinófilos no escarro e/ou sangue periférico e/ou reversibilidade significativa do fluxo aéreo para β 2-agonistas de curta ação.

Esses pacientes podem ser definidos como tendo um fenótipo particular de DPOC chamado ACO devido à sua semelhança com asma, como ilustrado na *Figura 4*, a DPOC com características de inflamação Th2 ou DPOC eosinofílica. Outros portadores de asma com exposição significativa ao tabagismo podem levar ao desenvolvimento de algumas características únicas da DPOC, a saber: obstrução não totalmente reversível do fluxo aéreo, redução da capacidade de difusão dos pulmões de monóxido de carbono e enfisema em tomografia computadorizada. Esses indivíduos também podem ser considerados como portadores de ACO. É importante destacar que a exposição significativa ao tabagismo (ou outros nocivos) é necessária para o diagnóstico de DPOC e, portanto, de ACO. Caso contrário, a limitação do fluxo aéreo não totalmente reversível em um paciente asmático na ausência de exposição significativa ao tabagismo deve ser diagnosticada com asma crônica irreversível, mas

não ACO (Mekov et al., 2021).

Mais estudos são necessários para melhor compreender a ACO quanto à sua fisiopatologia, modulações e tratamentos, a fim de auxiliar no diagnóstico preciso e melhorar as estratégias de tratamento.

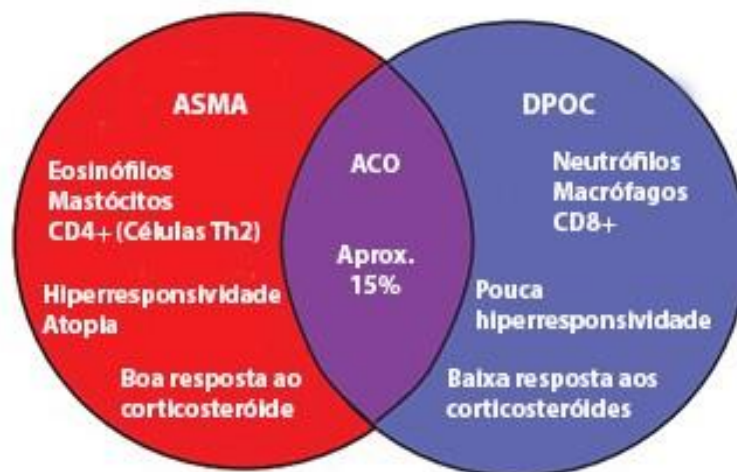


Figura 4. Características comuns da asma e DPOC na ACO. **Fonte:** Adaptado de Barnes, 2017.

1.9 Inibidores de Proteases de Origem Vegetal (ou Vegetais)

Amplamente distribuídos na natureza, os inibidores de protease (IPs) são encontrados em animais, plantas e microorganismos. Particularmente abundantes em plantas, representam cerca de 1-10% da proteína total em órgãos de armazenamento, como sementes e tubérculos (Bonturi et al., 2022).

Os inibidores de proteases têm como uma de suas funções promoverem a inibição de enzimas proteolíticas ou aumentar os níveis de antiproteases endógenas, tendo como objetivo evitar a progressão das doenças. Como moléculas sinalizadoras, estão presentes na hemostasia, morte celular, proliferação celular, replicação do DNA, resposta inflamatória e remodelamento do tecido, tendo a capacidade de regular a apoptose e o ciclo celular (Ferreira et al., 2013; Oliveira et al., 2016).

Obtidas a partir de sementes de leguminosas, muitas dessas proteínas bloqueiam proteases de origem animal e podem ser consideradas para o desenvolvimento de compostos com atividade biológica. A modulação das vias de sinalização intercelular por membros da família dos inibidores de protease *Kunitz*, apontam que estes possam ser considerados agentes terapêuticos (Shigetomi et al., 2010).

Existe várias famílias de inibidores, porém a planta tipo *Kunitz* representa uma das importantes famílias de inibidores de proteases, que contêm peso molecular de 20-22 kDa, e podem ser compostos por uma ou duas cadeias polipeptídicas, ligadas por uma ou duas ligações dissulfeto. Suas estruturas podem não ter resíduos de cisteína ou conter até cinco resíduos de Cys. Sendo os inibidores de *Kunitz* geralmente conhecidos como proteínas de defesa, onde apresentam diferentes atividades, como efeito antibacteriano e atividades antifúngicas e também atuam na inflamação, coagulação, trombose e câncer. Esses inibidores geralmente têm um sítio reativo localizado na região que se liga à enzima e a formação do complexo enzima-inibidor ocorre em estequiometria 1:1. Esses inibidores podem ser de cadeia polipeptídica simples ou dupla de proteínas, com variação no número de resíduos de cisteína e padrões de pontes dissulfeto. O inibidor de tripsina *Bauhinia rufa* (BrTI) é um inibidor de cadeia simples sem resíduos de cisteína. Já a *Bauhinia bauhinioides*, é um inibidor de calicreína (BbKI) e também é um inibidor de cadeia simples. No entanto, contém uma cisteína resíduo. Por fim, o inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) contém quatro cisteínas; no entanto, eles são de cadeia dupla de polipeptídeos, proteínas ligadas por duas pontes S-S (Bonturi et al., 2022).

Estudos trazem evidências, como ilustrado na *Figura 5*, de que os inibidores de proteases possuem a propriedade de inibirem as atividades da protease durante a homeostase, lesão tecidual, inflamação e progressão de doenças oncológicas. Exercendo um papel como contribuidor significativo para doenças inflamatórias, pesquisadores apresentaram interesse em seu potencial, estudando sua função para drogas no tratamento de diversas doenças (Bortolozzo et al., 2018).

Novas estratégias terapêuticas objetivando o controle da produção e/ou inativação das proteinases para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica vêm sendo discutidas recentemente (Almeida-Reis et al., 2017).

INIBIDOR DE PLANTA KUNITZ E SUAS AÇÕES

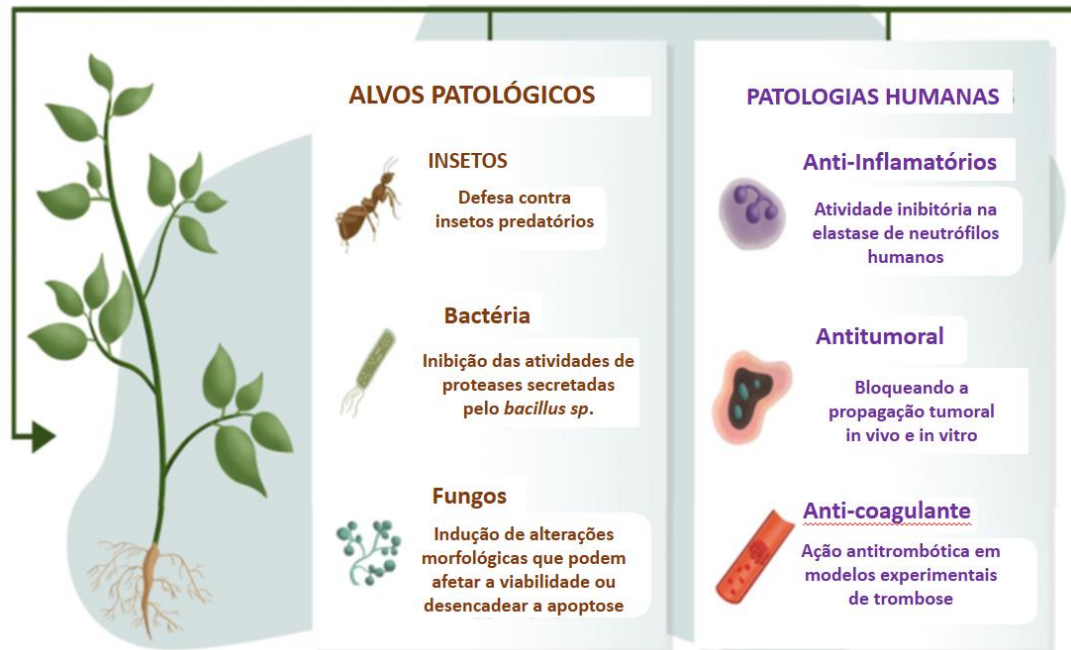


Figura 5. Figura ilustra os diferentes usos de inibidores de protease, como também mostra que os inibidores são ativos em patologias associadas à inflamação, trombose e câncer. **Fonte:** Traduzida do artigo de Bonturi et al., 2022.

Estudos mostram que as reações inflamatórias decorrentes da invasão microbiana, leva a migração contínua e degranulação de neutrófilos, que liberam proteases do hospedeiro, enzimas importantes na resposta inflamatória como HNE e CatG. A enzima CatG induz a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos e ativa as quimiocinas. Já o HNE ativa o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e induz a expressão de IL-8, como exemplo na DPOC. Segundo Bonturi et al. (2022), sabe-se que o papel das proteases no enfisema, porém, ainda não está claro: quais células e/ou proteases têm funções desenvolvimento e progressão da doença. Classes de serina, cisteína e/ou metaloprotease foram relatadas como as proteases mais prováveis de estarem envolvidas na patogênese da DPOC e pode ser a razão para o sucesso do uso dos inibidores de protease em modelos *in vivo* de lesão pulmonar induzida por elastase e no modelo de Asma, apresentando redução na expressão de células TNF- α , MMP-9, MMP-12, TIMP-1, NOex e iNOS nas vias aéreas e paredes alveolares com tratamento com inibidor. Estudos mostram atenuação da relação de volume de 8-iso-PGF₂, colágeno e fibras elásticas nas vias aéreas e paredes alveolares, indicando que essas proteínas reduzem a inflamação pulmonar, remodelamento, estresse oxidativo e alterações mecânicas (Bonturi et al., 2022).

O primeiro inibidor de protease de plantas a ser isolado foi o *Enterolobium contortisiliquum*, denominado EcTI, como ilustrado na *Figura 6*, que pertence à família Leguminosae e subfamília Mimosoidea. Encontrado no Brasil, ele é oriundo de uma grande árvore, e popularmente conhecido como Orelha-de-Macaco, Timbaúba, Ximbó, Tamburé, entre outros (Zhou et al., 2013). A equipe da Professora Dra. Maria Luiza Viela Oliva, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), isolou as sementes do *Enterolobium contortisiliquum* e o EcTI foi extraído. O EcTI possui massa molecular de 20.000 Daltons (Da). Sua função é inibir a atividade de tripsina, quimiotripsina, calicreína plasmática humana (HuPK), plasmina, elastase de neutrófilo humano e impedir a ativação da MMP-2 e MMP-9 (Oliva et al., 2009; Nakahata et al., 2011). Também muito estudado na área da oncologia, ele é citotóxico para células de câncer colorretal, algumas células do câncer de mama, linhagem de leucemia humana sem afetar fibroblastos e células regenerativas, câncer gástrico Hs746T, glioblastoma U87 e fibrossarcoma em camundongos. O EcTI, não apresentou ação citotóxica sobre os fibroblastos humanos, mas inibiu a adesão, migração e invasão das células Hs746T, sem efeito sobre a adesão de fibroblastos. Referente à linhagem U87, a co-cultura com células tronco mesenquimais humanas foi potencializada pelo uso do EcTI (Nakahata et al., 2011, De Paula et al., 2012; Bonturi et al., 2018; Bonturi et al., 2022).

O estudo de Theodoro-Jr e colaboradores (2017) demonstra, a partir de um modelo experimental de enfisema induzido pela elastase em camundongos, que o uso terapêutico do EcTI foi capaz de reduzir a inflamação, o remodelamento tecidual e o estresse oxidativo no pulmão destes animais

De forma semelhante, em modelo experimental de asma induzido por ovoalbumina, Rodrigues e colaboradores (2019) mostraram que o inibidor de protease de plantas, EcTI, atenuou a inflamação o remodelamento tecidual e o estresse oxidativo no modelo de asma.

Devido a esses estudos, foram sintetizados vários peptídeos derivados da sequência primária do EcTI, sendo o peptídeo denominado Pep-3-EcTI escolhido nesse estudo, com o objetivo de verificar e comparar o efeito observado com os obtidos com a proteína nativa no modelo experimental de ACO.

O peptídeo foi sintetizado pela empresa WatsonBio (Texas, USA), assumindo uma pureza superior a 98% e remoção adicional de ácido trifluoroacético, um possível interferente dos ensaios realizados no projeto. A sequência do Pep-3-EcTI não será apresentada por estar em pedido restrito de patente.



Figura 6. Árvore, frutos e sementes que contêm o EcTI. **Fonte:** Dissertação de Mestrado de Theodoro-Junior, 2017, FMUSP.

O segundo peptídeo incluído na pesquisa foi o BbKI, do gênero *Bauhinia*, pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae onde é encontrado em áreas tropicais, conforme ilustrado na *Figura 7*. Aproximadamente 570 espécies são conhecidas, sendo popularmente chamadas de “Pata de Vaca” ou “Unha de Boi”. Os estudos farmacológicos e fitoquímicos demonstram sua constituição principal em glicosídeos, esteróides, terpenos, lactonas e flavonoides (Oliva e Sampaio, 2009; Almeida-Reis *et al.*, 2017). O inibidor BbKI é um potente bloqueador de serino proteases, em especial da caliceína plasmática humana (HuPK), cuja uma das funções importantes é liberar as cininas envolvidas na inflamação (Bonturi *et al.*, 2022).



Figura 7. Árvore, ramos e flores que contêm BbKI. **Fonte:** Dissertação de Mestrado de Silva (2022), FMUSP.

As sementes de *Bauhinia* apresentam inibidores de serina e cisteína proteases. O BbKI é um inibidor tipo Kunitz com uma massa molecular por volta de 18kDa e uma inibição de constante aparente de 2.4nM para calicreína e 33nM para plasmina (Oliva et al., 1999; Araújo et al, 2005). Assim, as calicreínas são glicoproteínas presentes no tecido, encontradas nos neutrófilos, células glandulares e nos fluidos biológicos, e apresentam funções como: transporte de íons, transporte de glicose em sinergia com insulina e regulação do fluxo sanguíneo através da cinina (Oliveira et al., 2016). O peptídeo derivado desse inibidor utilizado nesse estudo foi denominado Pep-BbKI.

O grupo da Prof. Maria Luiza Vilela Oliva, no Departamento de Bioquímica da UNIFESP também isolou das sementes de *Bauhinia rufa*, o inibidor de protease BrTI (*Bauhinia rufa* Trypsin Inhibitor) (Nakahata et al., 2006), em cuja estrutura se distingue dos demais inibidores por apresentar as sequências dos tripeptídeos RGD e RGE, as quais estão relacionadas com a inibição da adesão celular. É formado por uma cadeia polipeptídica única de 20 kDa, sem resíduos de cisteína em sua estrutura primária e apresentando um resíduo de arginina em seu sítio reativo. Essa proteína não inibe a atividade de quimotripsina, elastase pancreática porcina, elastase de neutófilo humano, fator Xa, trombina humana, calicreína plasmática porcina e plasmina. Entretanto, o inibidor mostrou especificidade para a inibição de tripsina e calicreína plasmática humana (Nakahata et al., 2006). A presença dos motivos conservados, os tripeptídeos RGD/RGE é bastante interessante, pois é a sequência sinalizadora que receptores, como as integrinas, reconhecem para participar em vários eventos bioquímicos, como a adesão, migração e diferenciação celulares, apoptose, agregação plaquetária, inflamação e o câncer (Ruoslahti, 1986; Hostetter, 2000). O

grupo já vem estudando os efeitos de peptídeos sintéticos que compõem as tríades em diversos processos fisiopatológicos, como câncer de mama triplo-negativo (Valente, 2022) e em trombose (Medina et al., 2022). Nesse estudo, estudamos o peptídeo denominado Pep-BrTI que contém a sequência RGE.

Justificativa para o Estudo

Apesar de toda a eficácia terapêutica dos corticosteroides e outras drogas no tratamento das exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica e da asma, boa parte dos pacientes com essas doenças não respondem ao tratamento ou apresentam efeitos colaterais do uso de medicamentos. Recentemente, novas estratégias clínicas visando o controle da produção e/ou inativação das proteases estão sendo discutidas para o tratamento da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica. Como as proteases deixaram de ser consideradas simplesmente como proteínas de degradação enzimática e tornaram-se importantes moléculas sinalizadoras envolvidas na inflamação, os inibidores de protease estão sendo intensamente investigados. Alguns inibidores de proteases, como o EcTI e o BbKI, foram estudados e mostram um importante efeito anti-inflamatório em modelos experimentais de enfisema induzido por elastase e modelo de asma induzido pela ovoalbumina. Porém, as ações do Pep-3-EcTI, Pep-BbKI e Pep-BrTI não foram estudadas ainda. Dessa forma, este estudo propõe-se estudar a modulação pelos peptídeos dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em modelo de Sobreposição Asma-DPOC.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos dos peptídeos derivados da sequência primária de Pep-3-EcTI, Pep-BbKI, Pep-BrTI comparando seus efeitos com o tratamento com corticosteroide em modelo experimental de ACO, comparativamente aos modelos de asma induzido por ovoalbumina e enfisema induzido por elastase, avaliando os aspectos funcionais e histopatológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) avaliação de hiperresponsividade à metacolina;
- b) avaliação do óxido nítrico exalado;

Avaliar nas vias aéreas e no parênquima pulmonar os seguintes parâmetros:

- c) resposta inflamatória: recrutamento de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, expressão celular de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), anti-inflamatórias (IFN- γ e IL-10) e linfocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17);
- d) Avaliação do Intercepto linear médio (Lm);
- e) avaliação de remodelamento: conteúdo de fibras colágenas, TGF-beta; MMP-9, MMP-12;
- f) resposta de estresse oxidativo: expressão celular de iNOS;
- g) mecanismos envolvidos: expressão celular do NF-KappaB.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Esse estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA), processo número: 1030/2018. Foram utilizados para esses modelos experimentais, camundongos Balb/c, sexo masculino, com idade de sete semanas e com peso inicial de 20-30g.

Todos provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram manejados 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. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Terapia Experimental I (LIM-20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Material Vegetal

3.2.1 Peptídeo Sintético

Os peptídeos foram desenhados e sintetizados com base na sequência das proteínas EcTI, BbKI e BrTI, estabelecendo-se a menor estrutura responsável pela função inibitória, e correlacionando-se à estrutura e especificidade de ação de cada proteína. A sequência do peptídeo Pep-3-EcTI, está em processo de patenteamento e, por isso, não será divulgada na dissertação. O peptídeo, chamado de peptídeo-BbKI (Pep-BbKI), tem como sequência Ac-RPGLPVRFESPL-NH₂. Já o peptídeo (Pep-BrTI) apresenta a sequência (Ac-I-V-Y-Y-P-D-R-G-E-T-G-L-NH₂) derivados da sequência primária de BrTI. Eles foram sintetizados respeitando-se um grau de pureza avaliada por cromatografia de fase reversa, em sistema de HPLC igual ou superior a 98%. A síntese foi feita por uma empresa americana, a WatsonBio, Houston, Texas, EUA.

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 11 grupos de acordo com o protocolo a que foram submetidos:

- A) **Grupo SAL:** Inalações com soro fisiológico (SF) estéril (n=7);
- B) **Grupo OVA:** Inalações com solução de ovoalbumina (OVA) (n=8);
- C) **Grupo ELA:** Instilações intratraqueais de elastase (ELA) (n=6);
- D) **Grupo ACO:** Inalações com solução de OVA e instilações intratraqueais de elastase (n=7);
- E) **Grupo ACO-DX:** Inalações com solução de OVA, instilações intratraqueais de elastase e tratamento com dexametasona (DX) (n=8);
- F) **Grupo ACO-Pep-3-EcTI:** Inalações com solução de OVA, instilações intratraqueais de elastase e tratamento com o peptídeo sintético derivado do EcTI (n=8);
- G) **Grupo ACO-Pep-BbKI:** Inalações com solução de OVA, instilações intratraqueais de elastase e tratamento com o peptídeo sintético derivado do BbKI (n=8);
- H) **Grupo ACO-Pep-BrTI:** Inalações com solução de OVA, instilações intratraqueais de elastase e tratamento com o peptídeo sintético derivado do BbKI (n=6);
- I) **Grupo SAL-Pep-BbKI:** Instilações intraperitoneais e inalações com SF0,9% estéril, além de tratamento com o pep-BbKI (n=7);
- J) **Grupo SAL-Pep-EcTI:** Instilações intraperitoneais e inalações com SF0,9% estéril, além de tratamento com o pep-BbKI (n=8);
- K) **Grupo SAL-Pep-BrTI:** Instilações intraperitoneais e inalações com SF0,9% estéril, e tratamento com o pep-BbKI (n=7);

No nosso estudo, tivemos uma perda total de oito animais durante o processo do estudo.

3.4 Modelo Experimental de Asma

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina (OVA) teve a duração de 28 dias, como ilustrado na *Figura 8*. Os camundongos receberam solução de 50 mg de ovoalbumina (Sigma - Aldrich St.Louis, MO) emulsificada com 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) por via intraperitoneal (I.P) nos dias 1 e 14. Nos dias 21, 23, 25 e 27 os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em soro fisiológico (NaCl) à 0,9% na concentração de 10 mg/mL (1%). O tempo em que os animais estiveram em contato com o aerossol foi de 30 minutos. Ao mesmo tempo, o Grupo Controle recebeu a solução salina (NaCl) à 0,9% e hidróxido de alumínio (Alumen) (6 mg) por via intraperitoneal (I.P) e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos (Toledo et al., 2013).

3.5 Modelo Experimental do Enfisema

Os camundongos foram anestesiados com inalação de isoflurano (Isofurine® 1mL/mL, Cristália LTDA, Itapira, SP, Brasil) e receberam por via intratraqueal (I.T) no dia 21 do protocolo experimental a instilação intratraqueal de elastase pancreática porcina (PPE) (E1250-500mg elastase de pâncreas suíno - Tipo I, 4 unidades/mg de proteína, 41,7mL, 12mg de proteína/mL; 5 unidades/mg de proteína, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) – na dose e concentração de 25 U PPE/100 g de peso corporal dissolvido em 40-µL de solução salina (Ikeda *et al.*, 2014) , como ilustrado na *Figura 8*. Todos os animais foram avaliados sete dias após esta administração de elastase.

3.6 Modelo Experimental de ACO

Os camundongos deste grupo experimental foram submetidos aos dois protocolos experimentais anteriormente descritos (modelo de asma e lesão pulmonar induzida por elastase), seguindo os protocolos de doses e datas, como ilustrado na *Figura 8* (Toledo *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017).

Portanto, os camundongos receberam solução de 50mg de ovoalbumina (Sigma - Aldrich) e 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil), por via intraperitoneal (I.P), nos dias 1 e 14.

Nos dias 21, 23, 25 e 27 os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl à 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10mg/mL (1%). O tempo em que os animais ficaram em contato com o aerossol foi de 30 minutos.

No dia 21 do protocolo, os camundongos foram anestesiados com isoflurano inalado (Isofurine®) e instilado EPS (EMD Chemicals,) – na dose e concentração de 25 U EPS/100g de peso corporal dissolvido em 40- μ L de solução salina, via intratraqueal.

3.7 Tratamento com os Peptídeos (*Pep-3-EcTI*, *Pep-BbKI*, *Pep-BrTI*)

Os peptídeos (*Pep-3-EcTI*, *Pep-BbKI*, *Pep-BrTI*) foram administrados na dose de 2 mg/kg por via intraperitoneal uma hora antes de cada administração de aerossol com ovoalbumina nos dias 22, 23, 25 e 27 do protocolo experimental da ACO (Theodoro-Jr et al., 2017), como ilustrado na *Figura 8*.

3.8 Tratamento com Dexametasona

A dexametasona foi administrada por via intraperitoneal 1 hora antes da administração de aerossol com ovoalbumina nos dias 22, 23, 25 e 27 do protocolo experimental da ACO, na dose de 5mg/kg (Toledo et al., 2013), como ilustrado na *Figura 8*.

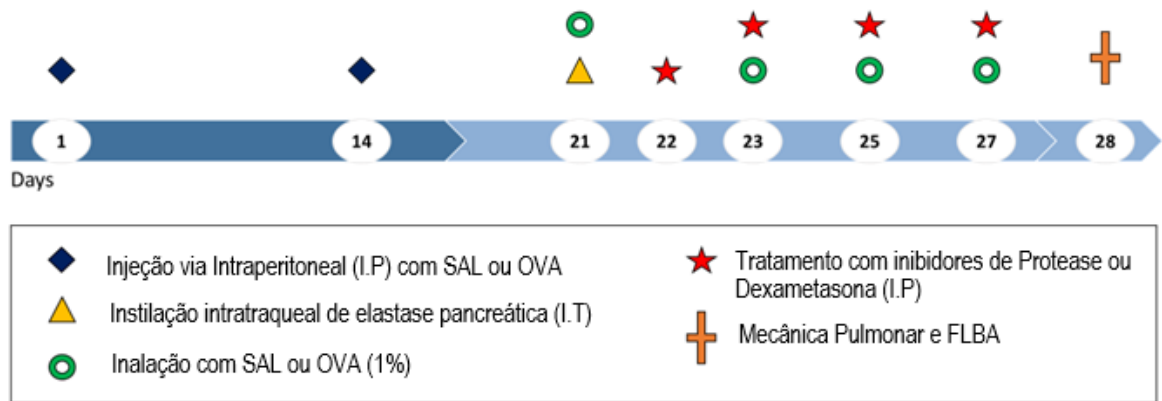


Figura 8. Descrição do protocolo experimental. Nos dias 1 e 14, os camundongos foram submetidos à injeção intraperitoneal com uma solução ou de salina (soro fisiológico à 0,9%) ou ovoalbumina (50mg de ovoalbumina e 6mg de hidróxido de alumínio). No dia 21, foi realizada a instilação intratraqueal de elastase pancreática, na dose e concentração de 25U EPS/100 g de peso corporal, dissolvida em 40µL de solução salina e após inalação com OVA (concentração de 1%), dependendo do tratamento a que os camundongos foram submetidos. Para os grupos tratamento, com início no dia 22 e seguindo pelos dias 23, 25 e 27 foram realizados tratamentos, com dexametasona (dose de 5mg/kg) ou peptídeo (dose de 2mg/Kg) 1 hora antes da inalação de OVA diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10mg/mL (1%). No dia 28 o animal foi submetido à análise da mecânica pulmonar, à coleta do lavado bronco alveolar e posterior análise morfométrica. **Fonte:** Acervo próprio.

3.9 Avaliações da Mecânica Pulmonar e Coleta de Óxido Nítrico Exalado (NOex)

Após 24 horas do término do protocolo experimental no 28º dia do protocolo, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/kg I.P) e traqueostomizados. Uma cânula de poliuretano foi fixada com fio de nylon através de uma sutura pelo óstio da traqueostomia. Os animais foram conectados a um aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá*) e ventilados com volume corrente de 10 mL/kg, frequência respiratória de 150 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal.

O gás para coleta do NO exalado foi obtido na porção expiratória do ventilador através de um balão impermeável ao óxido nítrico (*Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, USA*). Após a coleta do balão de NO exalado por 10 minutos, os balões foram selados para posterior análise.

A concentração média de NO foi registrada em partes por bilhão (ppb), como um índice de concentração de NO no ar exalado. Sendo assim, o óxido nítrico exalado foi mensurado por quimioluminescência, por intermédio de um analisador de resposta

rápida (208 NOA- *Nitric Oxide Analyzer* – Sievers Instruments Inc, Boulder, CO, USA), como ilustrado na *Figura 9*.



Figura 9. Analisador de resposta rápida (208 NOA- *Nitric Oxide Analyzer* – Sievers Instruments Inc, Boulder, CO, USA). **Fonte:** Imagem retirada da tese de Theodoro-Junior, 2017.

Após, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica do sistema respiratório (Possa et al., 2012; Toledo et al., 2013), onde os valores de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) foi calculada como função das diferentes frequências produzidas, como ilustrada na *Figura 10*.

Durante a ventilação mecânica foi realizada a medida basal dos animais após 30 segundos de ventilação. Em seguida, foi realizado o desafio com inalação de metacolina nas doses de 3, 30, 300mg/mL, no primeiro, segundo, e terceiro minuto e obtido o percentual de aumento dos parâmetros comparativamente ao valor basal da metacolina.

Os parâmetros que buscamos para descrever o modelo pulmonar foram Rrs (resistência do sistema respiratório), Ers (elastância do sistema respiratório), Raw (resistência de vias aéreas maiores), Gtis (resistência de vias aéreas menores ou tecidos), Htis (elastância de tecidos pulmonares) (Toledo et al., 2013). Para descrever o modelo pulmonar foram utilizados: %Rrs (resistência do sistema respiratório), %Ers (elastância do sistema respiratório), através da equação do movimento do sistema respiratório, descrita a seguir:

$$Ptr(t) = Rrs.V'(t) + Ers.V(t)$$

onde: t é tempo, Ptr é pressão traqueal, Rrs é resistência do sistema respiratório, Ers é elastância do sistema respiratório V' é fluxo aéreo e V é o volume pulmonar.

Utilizamos para descrever a %Gtis (resistência de vias aéreas menores ou tecido), %Htis (elastância do tecido pulmonar) e %Raw (resistência de vias aéreas maiores), (Toledo *et al.*, 2013) a seguinte fórmula:

$$Z(f) = Raw + i(2\pi f)law + \frac{[Gtis - i*Htis]}{(2\pi f)^\alpha}$$

Onde Z (f) é a impedância do sistema respiratório em função da frequência, RAW é a resistência das vias aéreas; i é a unidade imaginária; f é frequência; law é a inertância de vias aéreas e $\alpha = (2/\pi) * \arctan(Htis/Gtis)$.



Figura 10. Aparelho de ventilação mecânica para pequenos animais (FlexiVent, Scireq, Montreal, Canadá) e balão impermeável ao óxido nítrico (Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, USA). **Fonte:** Imagem de acervo próprio.

Ao término da avaliação, o abdome foi aberto e foi coletado, através de uma seringa heparinizada (1000 UI), sangue intravenoso da veia cava inferior. Após, foi aberta a parede torácica anterior para remoção em bloco dos pulmões e coração para os estudos morfométricos e análises histológicas.

3.10 Coleta e Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

Logo após a mecânica, a coleta do lavado broncoalveolar foi realizada por intermédio da infusão de 0,5 mL de salina (soro fisiológico à 0,9%) por três vezes consecutivas (volume total de 1,5mL), pela cânula traqueal, com o uso de uma

seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rotações por minuto (rpm), a 5°C, por 10 minutos, e média de recuperação foi de 80%. O botão celular foi ressuspendido em 200- μ L de salina. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o hemocitômetro de *Neubauer* (400x). Para a contagem diferencial, 100- μ L do FLBA foram citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos e após seca a lâmina foi corada pela técnica de *Diff-Quick*. A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de 300 células/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X) (Martins-Oliveira et al., 2016). Ao final da avaliação, os pulmões foram removidos em bloco com o coração para os estudos morfométricos e análises histológicas/histoquímicas.

3.11 Histologia e Imuno-Histoquímica

Após a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4- μ m de espessura e as lâminas foram coradas, conforme a descrição a seguir.

3.11.1 Avaliação das Imagens para Medida de Densidade Óptica

A medida da densidade óptica foi o método utilizado para a análise morfométrica de fibras colágenas na parede das vias aéreas e no parênquima pulmonar. As imagens foram obtidas utilizando-se um microscópio *Leica DM4000B* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) e uma câmera digital *Leica DFC420* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) conectados a um computador através do software *Leica Qwin* (*Leica Microsystems, Cambridge, Inglaterra*), que adquiria as imagens. Foram fotografadas 4 vias aéreas com ampliação de 400x e 10 campos de parênquima pulmonar.

As imagens foram processadas pelo software *ImageProPlus* (*Media Cybernetics, Bethesda, MD*), que permite informar um limiar de tons de cores (“*threshold*”) que representam as áreas positivas, de modo a quantificar a área pré-determinada. Foram definidos dois limiares binários de cores, um para o cálculo das fibras (de acordo com a coloração) e outro para as vias aéreas (*Figura 9*). Assim, a proporção de fibras de colágenas por área de vias aéreas e septos alveolares foram

quantificadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de área positiva (fração de volume).

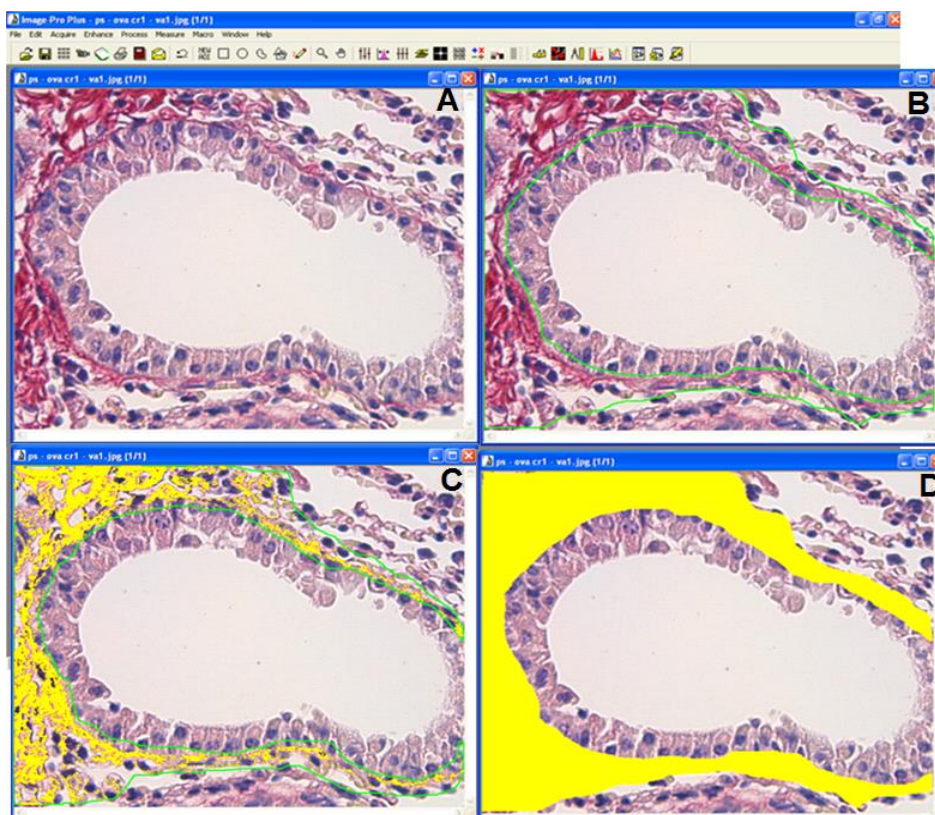


Figura 11. Exemplo da sequência de procedimentos realizados no *software ImageProPlus* para quantificação de fibras colágenas e elásticas. A: Foto da via aérea; B: Seleção da área a ser analisada; C: Áreas positivas de modo a quantificar as fibras; D: Área total do espaço selecionado. **Fonte:** Imagem retirada da Tese de Florencio,2019.

3.11.2 Quantificação de Fração de Volume de Fibras Colágenas

Para a contagem de fibras colágenas, os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram corados por 1 hora com Picro-Sírius (*Direct Red 80*, C.I. 35780, *Aldrich, Milwaukee*, WI, EUA), à temperatura ambiente e posteriormente lavados em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de *Harris* por 6 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas. A leitura foi realizada no analisador de imagens e os resultados foram expressos em porcentagem de área de fibras positivas, conforme descrito na *Figura 11*.

Para a leitura do *Picro-Sírius* (fibras colágenas) as imagens foram capturadas utilizando um microscópio Leica DM2500 acoplado a uma câmera (Leica DFC420 Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), utilizando um software chamado *Infinity*

Capture (Lumenera Corporation, Canadá) e assim, adquirimos as imagens. O software *Image-Proplus 4.5* (NIH. MD, EUA), permitiu selecionar o espectro a ser analisado. Esses tons representam as áreas positivas quantificadas na área previamente estipulada e determinamos a fração de volume que foi expressa como porcentagem de fibras na área total do quadro (fração de volume) (Angeli et al., 2008; Camargo *et al.*, 2018).

3.11.3 Avaliação Imuno-Histoquímica

Para marcação das demais amostras, na imuno-histoquímica, os procedimentos foram realizados na seguinte sequência: recuperação antigênica, bloqueio e incubação com anticorpo primário, incubação com complexo de anticorpo secundário, coloração e contraste, sendo descrito: primeira desparafinação, seguida de hidratação, digestão ou recuperação antigênica na panela de pressão por 1 minuto a 125°C (usando tampões de Citrato PH6 ou EDTA PH 9, após essa etapa, o bloqueio de peroxidase foi realizado usando 10 volumes de peróxido de hidrogênio (3%), durante 5 minutos, e lavado 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS). Os anticorpos diluídos foram pipetados no tecido e as lâminas foram incubadas numa câmara úmida durante a noite (18 a 20 horas) no refrigerador.

Após incubação das lâminas no refrigerador e lavagem com PBS elas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo secundário Vector (coelho ou camundongo) por 30 minutos a 37°C, e lavadas novamente 2 x 5 minutos com PBS e depois incubadas em câmara úmida com o Complexo Conjugado Vector AB (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), por 30 minutos a 37° C, lavadas novamente em PBS e foi retirado o excesso de PBS com lenço de papel ao redor do tecido e pipetadas com solução cromogênica [70 mg de diamino-benzidina, DAB (DakoCytomation, Carpinteria, EUA), em 110 ml de tris-HCL]. As secções foram coradas com hematoxilina de *Harris* (Merck, Darmstad, Alemanha) e as lâminas foram montadas. Foram realizadas imunohistoquímica para os seguintes marcadores: IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, MMP-9, MMP-12, TNF- α , IFN γ , NF-KappaB, TGF- β e iNOS. Os dados referentes às diluições e especificações dos anticorpos estão descritos na *Tabela 1*.

Após estes procedimentos de realização da imuno-histoquímica, os cortes de pulmão foram analisados utilizando-se a Análise Morfométrica descrita a seguir.

Marcador	Especificação do anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Especificação do anticorpo secundário
IL-1β	SC-52012, L: A0719; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:50	anti-camundongo	L: ZG0715, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
IL-4	SC-53084, L: J1518; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:8000	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
IL-5	SC-398334, L:F1617; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:300	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
IL-6	LS-C746886, L: 144178; LSBio,WA,USA.	1:200	anti-coelho	L: ZF0103, Vector; Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG), CA, USA.
IL-10	SC-8438. Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:50	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
IL-13	SC-393365, L:G1715; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:8000	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
IL-17	SC-7927, L:A3113; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:100	anti-coelho	L: ZF0103, Vector; Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG), CA, USA.
IFN-γ	SC-8308;L:B2811; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:100	anti-coelho	L: ZF0103, Vector; Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG), CA, USA.
TNF-α	SC-52746, L: J2418; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:5000	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
MMP-9	SC-393859, L:6118; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:800	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
MMP-12	SC -30072; L: B1910; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:400	anti-coelho	L: ZF0103, Vector; Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG), CA, USA.
TGF-β	SC-130348, L: A0219; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:700	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.
iNOS	RB-9242-P, L: 9242P709C; Thermo Fisher Scientific, UK.	1: 150	anti-coelho	L: ZF0103, Vector; Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG), CA, USA.
NF-KappaB	SC-8008, L:B1119; Sta Cruz Biotechnology, CA, USA.	1:700	anti-camundongo	L: ZF0206, Vector; Vectastain Elite ABC Kit Peroxidase (Mouse IgG), CA, USA.

Tabela 1. Marcadores, especificações e diluições IL, interleucina; IFN, interferon; TNF, fator de necrose tumoral; MMP, metaloprotease; TGF, fator transformador de crescimento; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; NF-KappaB, fator nuclear KappaB.

Dessa maneira, as lâminas estavam prontas para leitura utilizando a técnica morfométrica descrita a seguir.

3.11.4 Análise Morfométrica

Foi utilizada a técnica de contagem de pontos, como ilustrado na *Figura 12*, por meio de um retículo contendo 50 retas e 100 pontos acoplado à ocular de um microscópio (E200Mv, Nikon Corporation, Tóquio Japão). O retículo utilizado possui uma área de $10^4\mu\text{m}^2$ no aumento de 1000x. A análise das vias aéreas foi realizada em quatro campos ao redor de três vias aéreas por animal e para os septos alveolares foi realizada a análise de dez campos pulmonares aleatórios. Todas as análises foram realizadas em aumento de 1000x. A contagem do número de células positivas foi realizada contando-se o número de células positivas presentes na área do retículo pelo número de pontos do retículo que caíam na área do tecido. Assim, realizando uma proporção de células positivas por área de tecido. O resultado foi expresso em células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$.

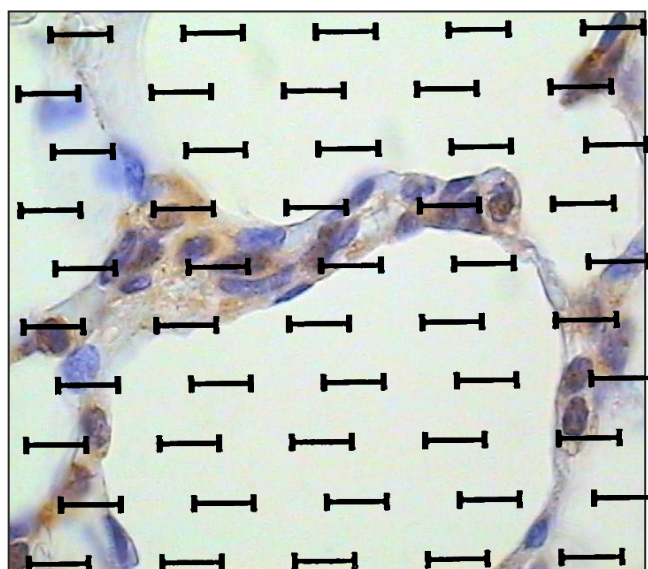


Figura 12. Posicionamento do retículo no parênquima pulmonar para realização da técnica de contagem de pontos. **Fonte:** Tese de Florencio, 2019, FMUSP.

3.11.5 Avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm)

Para a quantificação do Lm foi utilizada a técnica de pontos (Theodoro-Júnior et al., 2017). O Lm determina o índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais, permitindo indicar o grau de distensão alveolar (Margraf et al., 1991; Hsia et al., 2010). O retículo com área conhecida de 50 retas e 100 pontos foi acoplado no microscópio ótico (E200Mv, *Nikon Corporation*, Tóquio Japão) e a análise foi feita pela contagem de intersecções entre as retas do retículo e os septos alveolares. Foram analisados vinte campos distintos e aleatórios nos septos alveolares em um aumento de 200x, em lâminas coradas com H&E. O Lm foi calculado usando a equação: $Lm = 2500 \mu m / \text{número de vezes que houve intersecção da reta e o septo alveolar}$ (Taguchi et al., 2015; Fukuzaki et al., 2019).

3.12 Análise estatística

Os dados paramétricos foram apresentados por média \pm erro padrão e gráficos em formato de barras. Foi utilizado a análise unidirecional de variância (*One Way ANOVA*), seguida do método *Holm-Sidak*, utilizado para determinar a diferença entre os grupos com significância estatística. Para todas as análises utilizamos o software *SigmaPlot 11.0* (*Systat Software*, SPSS Inc., EUA) e foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Comparação dos Grupos Controles

Os resultados dos grupos SAL, SAL-Pep-3-EcTI, SAL-Pep-BbKI, SAL-Pep-BrTI não diferem entre si na grande maioria das análises, por conta disso, para facilitar a visualização dos gráficos e resultados, optamos por mostrar somente os dados do grupo SAL. Na tabela abaixo mostramos os resultados de alguns grupos na hiperresponsividade nas vias aéreas, marcadores inflamatórios, remodelamento e estresse oxidativo. Observamos um discreto efeito broncodilatador com o Pep-EcTI em %Ers e %Htis, mas como os valores de SAL nos demais parâmetros não foram diferentes vamos trabalhar na análise de todos os grupos usando o controle SAL.

	SAL	SAL-Pep-3-EcTI	SAL-Pep-BbKI	SAL-Pep-BrTI	Valor de p
Hiperresponsividade das Vias Aéreas					
Rrs	73,5±8,9	171,9±48,0	161,0±14,4	62,34±26,2	p=0,060
Ers	80,0±7,1	44,0±19,7	45,2±3,3	88,5±33,5	p=0,147
Gtis	52,1±9,3	45,8±6,6	85,2±13,6	108,7±52,8	p= 0,089
Htis	45,5±1,2	16,5±2,9 (DIFERENTE)	24,9±3,4	49,4±8,7	p=<0,001
Raw	158,8±36,4	201,2±34,1	159,6±35,9	157,1±96,6	p=0,861
NOex	13,3±1,7	18,4±2,5	18,9±0,4	19,3±3,7	p=0,173
Fluido do Lavado Broncoalveolar					
Células Totais	0,5±0,04	0,5±0,07	0,5±0,07	0,7±0,01	p=0,246
Eosinófilos	0,2±0,04	0,1±0,02	0,1±0,03	0,1±0,02	p=0,443
Neutrófilos	0,2±0,03	0,1±0,02	0,1±0,03	0,1±0,02	p=0,691
Linfócitos	0,2±0,03	0,2±0,03	0,1±0,02	0,1±0,02	p=0,119
Macrófagos	0,2±0,04	0,2±0,03	0,1±0,03	0,1±0,02	p=0,308
Marcadores Inflamatórios (células/10 ⁴ µm ²)					
IL-1-β - Vias Aéreas	0,4±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	0,9±0,2	p=0,179
IL-1-β - Septos Alveolares	0,4±0,2	0,8±0,2	0,4±0,2	0,6±0,2	p=0,274
IL-5 - Vias Aéreas	1,5±0,2	0,6±0,2	1,2±0,3	1,3±0,2	p=0,141
IL-5 - Septos Alveolares	1,2±0,2	0,9±0,1	0,7±0,2	0,9±0,2	p=0,171
IL-6 - Vias Aéreas	0,7±0,2	0,9±0,2	0,7±0,1	0,4±0,1	p=0,156
IL-6 - Septos Alveolares	0,5±0,2	0,6±0,1	0,4±0,1	0,1±0,1	p=0,063
IL-10 - Vias Aéreas	2,1±0,3	2,5±0,7	2,0±0,2	2,4±0,6	p=0,845
IL-10 - Septos Alveolares					
IL-13 - Vias Aéreas	2,8±0,3	3,8±0,4	2,5±0,3	2,5±0,3	p=0,069
IL-13 - Septos Alveolares	2,8±0,4	2,8±0,4	2,0±0,4	2,0±0,3	p=0,208
IL-17 - Vias Aéreas	2,2±0,2	1,4±0,3	1,7±0,2	1,4±0,3	p=0,093
IL-17 - Septos Alveolares	1,7±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2	1,1±0,3	p=0,168
TNF-α - Vias Aéreas	1,8±0,4	0,8±0,2	2,0±0,3	1,9±0,5	p=0,059
TNF-α - Septos Alveolares	1,7±0,3	1,3±0,3	2,0±0,4	2,5±0,4	p=0,107
INF- γ - Vias Aéreas	0,9±0,2	0,2±0,1	0,4±0,1	0,7±0,2	p=0,059
INF- γ - Septos Alveolares	0,7±0,2	0,1±0,1	0,5±0,1	0,5±0,2	p=0,080
Remodelamento					
MMP-9 -Vias Aéreas	0,3±0,04	0,8±0,2	0,4±0,1	0,5±0,1	p=0,084
MMP-9 - Septos Alveolares	0,9±0,1	1,0±0,2	0,3±0,1	0,9±0,2	p=0,057

MMP-12 -Vias Aéreas	1,8±0,3	1,1±0,2	1,1±0,2	1,4±0,2	p=0,226
MMP-12 - Septos Alveolares	0,6±0,2	1,1±0,2	0,5±0,1	0,9±0,2	p=0,112
Estresse Oxidativo					
iNOS - Vias Aéreas	3,3±0,6	2,3±0,3	2,2±0,3	2,1±0,2	p=0,206
iNOS -- Septos Alveolares	2,2±0,3	1,5±0,2	2,1±0,2	1,5±0,3	p=0,138
Fator de Transcrição					
NF-KappaB - Vias Aéreas	0,5±0,2	1,0±0,2	1,0±0,2	1,3±0,2	p=0,056
NF-KappaB - Septos Alveolares	0,5±0,2	0,9±0,2	0,5±0,1	1,1±0,2	p=0,055

Tabela 2. Resultados do teste estatístico entre os grupos controles: SAL, SAL-Pep-3-EcTI, SAL-Pep-BbKI e SAL-Pep-BrTI.

4.2 Hiperresponsividade à Metacolina

4.2.1 Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)

A Figura 13 mostra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Rrs (%Rrs) após teste com metacolina nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Na análise, ocorreu aumento da alteração %Rrs no grupo ACO ($625,1 \pm 81,0\%$) comparado ao grupo SAL ($73,5 \pm 8,9\%$) ($p < 0,05$). Observamos também aumento da alteração %Rrs no grupo ACO quando comparado aos grupos OVA ($356,9 \pm 36,5\%$) e ELA ($188,9 \pm 63,4\%$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Além disso, houve reversão total da %Rrs nos grupos tratamentos ACO-Pep-3-EcTI ($186,7 \pm 39,5\%$), ACO-Pep-BbKI ($260,7 \pm 31,5\%$), ACO-Pep-BrTI ($159,5 \pm 76,9\%$) e ACO-DX ($227,3 \pm 70,4\%$), já que os resultados foram diferentes do grupo ACO ($p < 0,05$ para todas as comparações) e foram equivalentes ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

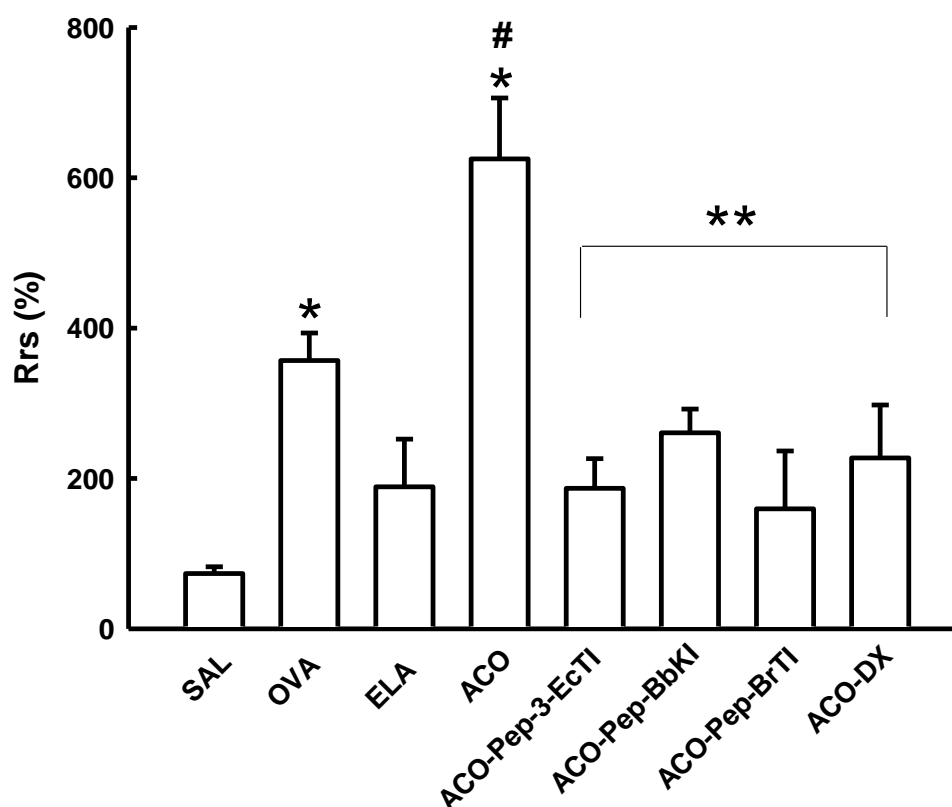


Figura 13. Porcentagem máxima de aumento da %Rrs após desafio com metacolina dos diversos grupos; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparado aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.2.2 Elastância do Sistema Respiratório (Ers)

A *Figura 14* demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Ers (%Ers) após metacolina nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento da alteração %Ers no grupo OVA ($203,5 \pm 33,8\%$) comparado ao grupo SAL ($80,0 \pm 7,1\%$) ($p < 0,05$), e houve redução da %Ers nos grupos ELA ($31,0 \pm 3,0\%$) e ACO ($25,3 \pm 3,9\%$) comparado ao grupo OVA ($p < 0,05$). Os grupos ELA e ACO não foram diferentes entre si. Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($118,9 \pm 28,1\%$), ACO-Pep-BbKI ($96,6 \pm 21,2\%$) e ACO-DX ($128,2 \pm 26,5\%$) aumentaram quando comparados aos valores de ACO, chegando a reverter totalmente a alteração da %Ers, pois foram diferentes do grupo ACO ($p < 0,05$ para todas as comparações) e semelhantes ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo tratamento ACO-Pep-BrTI ($60,7 \pm 7,5\%$) não apresentou aumento quando comparado a ACO e SAL.

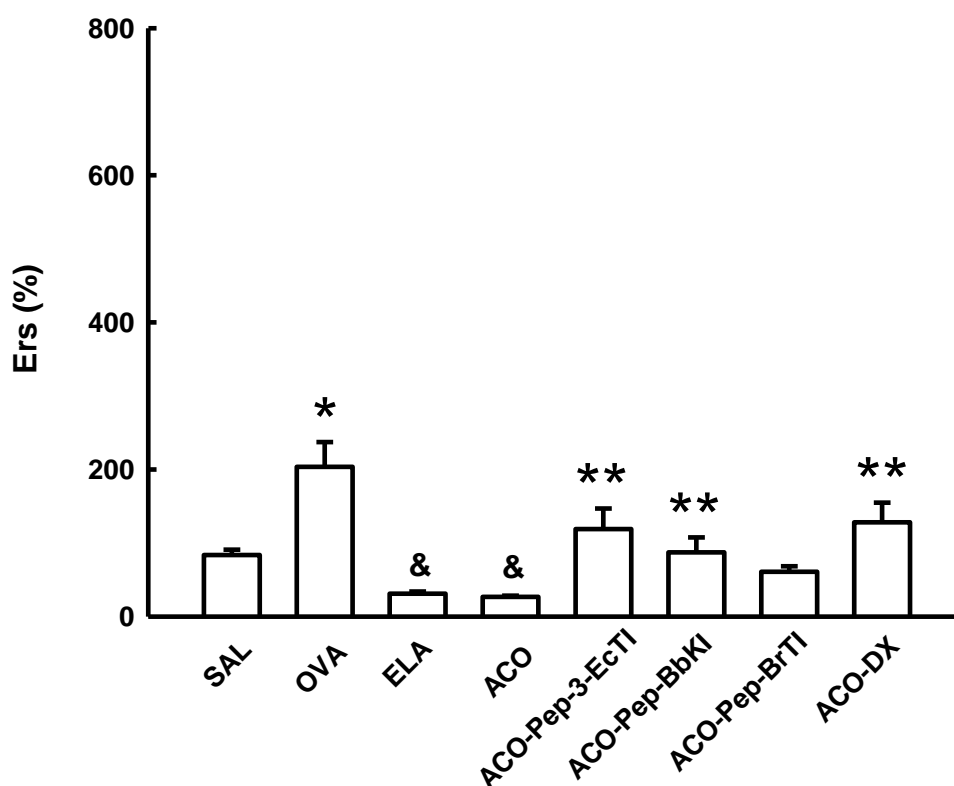


Figura 14. Porcentagem máxima de aumento da Ers após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; & $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.2.3 Resistência das Vias Aéreas (Raw)

A Figura 15 demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Raw (%Raw) após metacolina, nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Podemos observar aumento da %Raw nos grupos OVA ($454,8 \pm 68,6\%$) e ACO ($402,1 \pm 52,2\%$), quando comparados ao grupo SAL ($158,8 \pm 36,4\%$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Houve reversão total das alterações da %Raw nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($157,0 \pm 20,0\%$), ACO-Pep-BbKI ($211,0 \pm 53,8\%$), ACO-Pep-BrTI ($179,7 \pm 27,6\%$) e ACO-DX ($133,0 \pm 59,3\%$), pois foram diferentes do grupo ACO ($p < 0,05$) e semelhantes ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

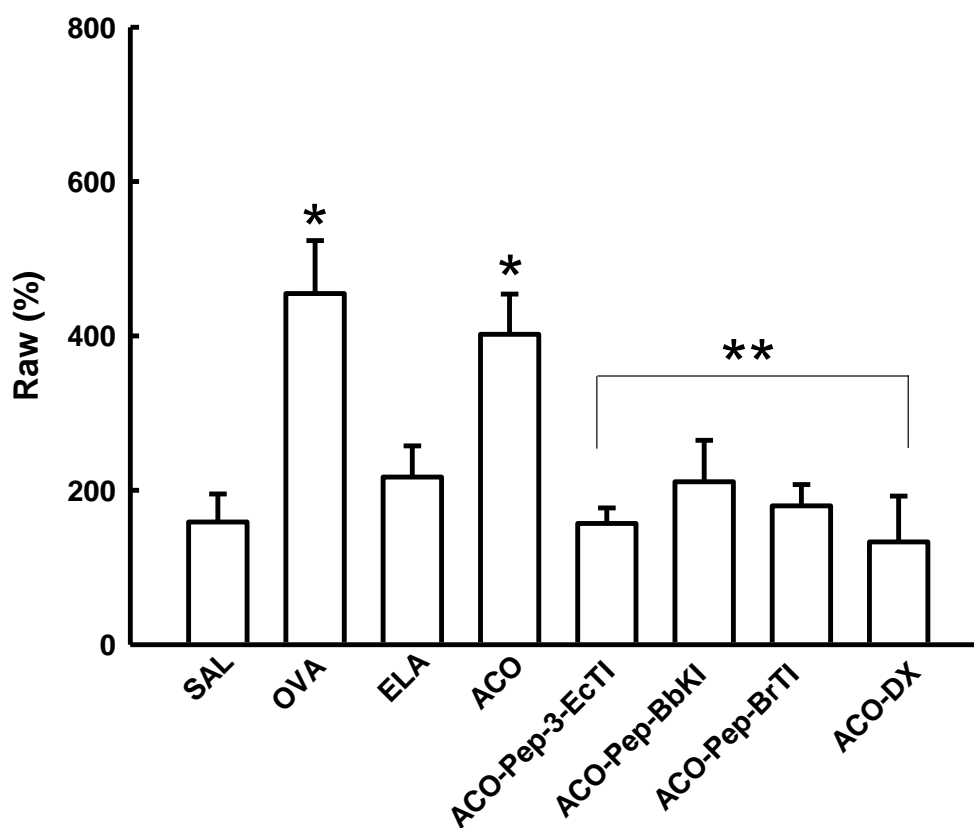


Figura 15. Porcentagem máxima de aumento da Raw após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.2.4 Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)

A *Figura 16* demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Gtis (%Gtis) após metacolina nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento da análise %Gtis nos grupos OVA ($114,7 \pm 12,7\%$) e grupo ACO ($187,6 \pm 21,6\%$) quando comparados ao grupo SAL ($52,1 \pm 9,4\%$) ($p < 0,05$ para as comparações). Além disso, houve uma reversão total da alteração da %Gtis nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($93,1 \pm 24,8\%$), ACO-Pep-BbKI ($47,9 \pm 15,4\%$), ACO-Pep-BrTI ($91,7 \pm 12,4\%$) e ACO-DX ($36,1 \pm 5,4\%$), sendo diferentes do grupo ACO e semelhantes ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamento não foram diferentes entre si.

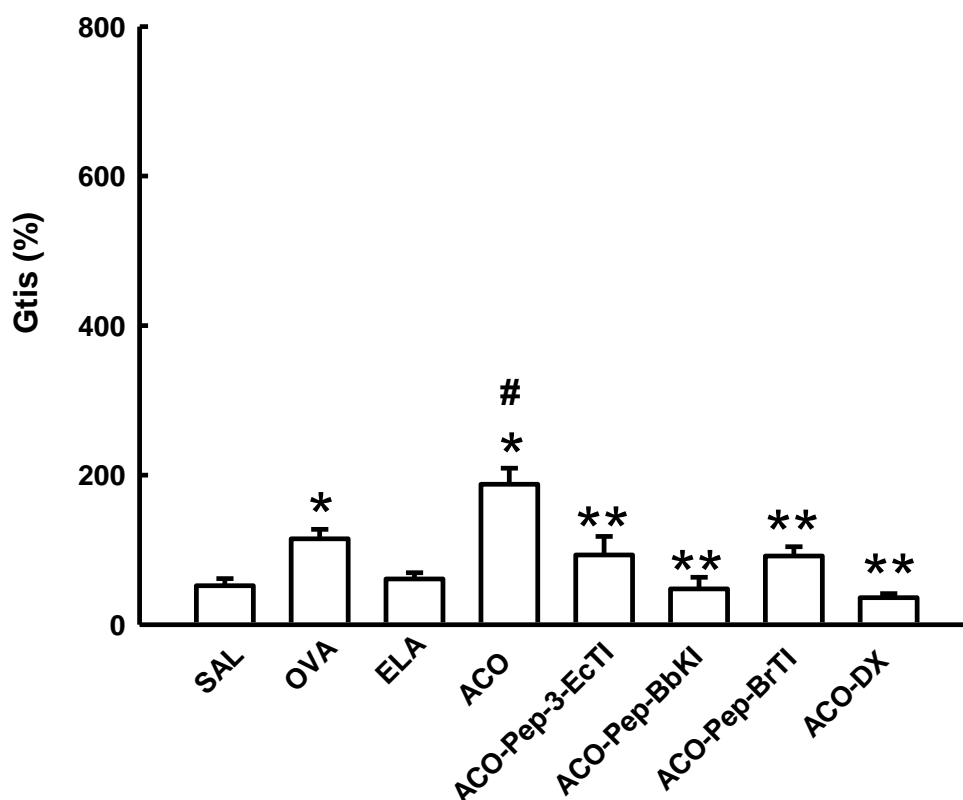


Figura 16. Porcentagem máxima de aumento da Gtis após desafio com metacolina dos grupos diversos; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.2.5 Elastância do Tecido Pulmonar (Htis)

A *Figura 17* demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Htis nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos que os grupos ELA ($19,6 \pm 5,4\%$) e ACO ($29,9 \pm 5,7\%$) não foram diferentes do grupo SAL ($45,5 \pm 1,2\%$), porém foram diferentes de OVA ($72,9 \pm 19,1\%$) ($p > 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamentos ACO-Pep-3-EcTI ($56,3 \pm 14,8\%$), ACO-Pep-BbKI ($53,8 \pm 17,9\%$), ACO-Pep-BrTI ($36,6 \pm 8,1\%$) e ACO-DX ($54,1 \pm 9,5\%$) não foram diferentes dos grupos SAL e ACO ($p > 0,05$ para todas as comparações).

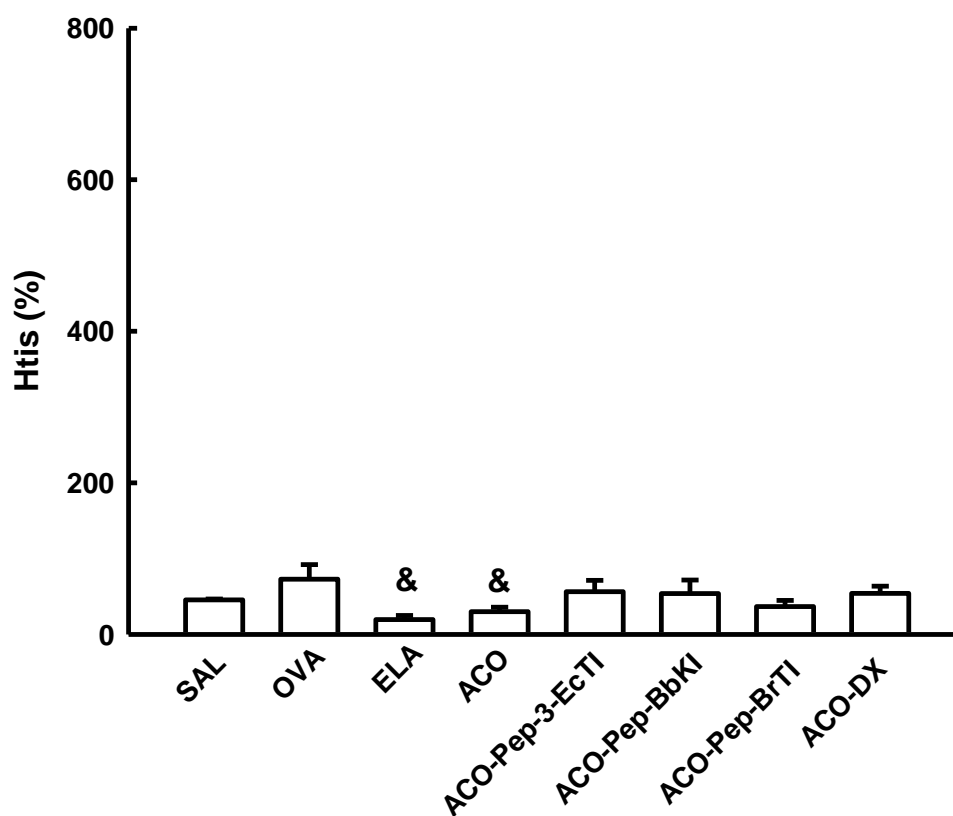


Figura 17. Porcentagem máxima de aumento da Htis após desafio com metacolina dos grupos diversos; & $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA.

4.3 Intercepto Linear Médio (Lm)

Na *Figura 18* temos a avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm) nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($25,8 \pm 0,9\%$), ACO-Pep-BbKI ($21,4 \pm 0,8\%$), ACO-Pep-BrTI ($25,3 \pm 1,3\%$) e ACO-DX ($29,3 \pm 1,3\%$). Observamos aumento do Lm no grupo ELA ($42,8 \pm 1,9\%$) e ACO ($59,2 \pm 1,9\%$) quando comparados com o grupo SAL ($27,2 \pm 2,8\%$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO é diferente de OVA ($29,2 \pm 1,8\%$) e ELA ($p < 0,05$). O grupo OVA não foi diferente do grupo SAL. A alteração de Lm, nos grupos tratados, foi revertida visto que foram diferentes do grupo ACO ($p < 0,05$ para ambas as comparações) e foram semelhantes ao grupo SAL ($p > 0,05$ para ambas as comparações).

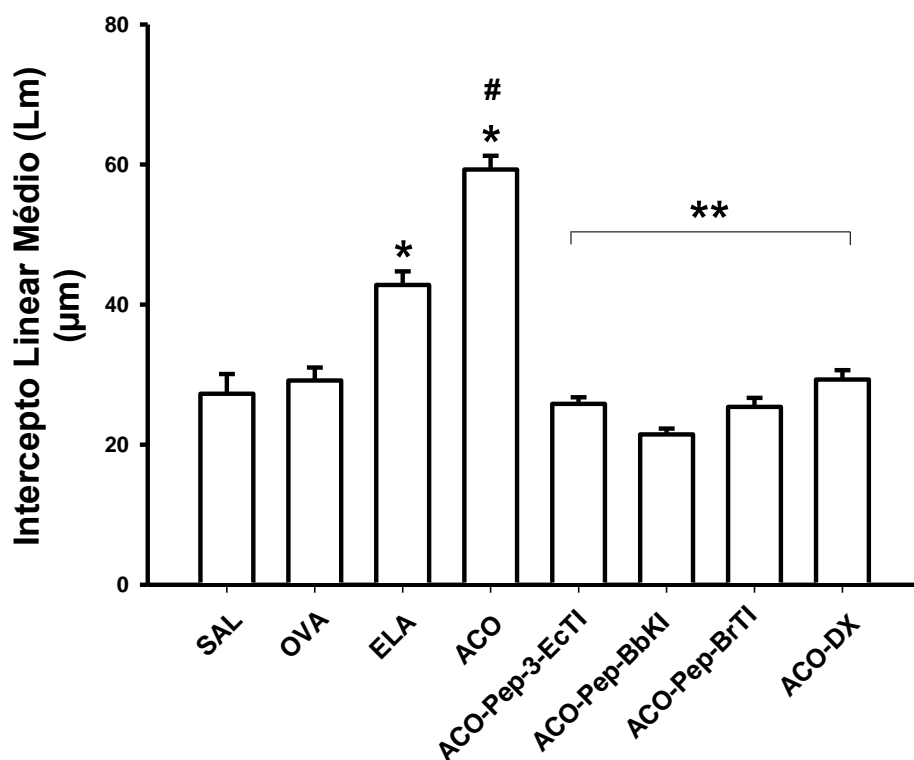


Figura 18. Gráfico dos valores do intercepto de Lm (µm) dos grupos controle e tratamento; * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ comparado ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo ACO.

4.4 Medida do Óxido Nítrico Exalado (NOex)

A Figura 19 demonstra a avaliação do óxido nítrico exalado - NOex nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Os grupos OVA ($31,2 \pm 5,0\%$) e ACO ($41,0 \pm 5,1\%$) apresentaram aumento no óxido nítrico exalado comparados ao grupo controle SAL ($13,3 \pm 1,7\%$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). No grupo ACO ($41,0 \pm 5,1\%$) ocorreu potencialização do aumento do óxido nítrico exalado, quando comparado ao grupo OVA ($31,3 \pm 5,0\%$) e ELA ($21,8 \pm 3,8\%$) ($p < 0,05$ para todas as comparações).

Os animais quando tratados com dexametasona e peptídeos ACO-Pep-3-ECTI ($16,7 \pm 2,2\%$), ACO-Pep-BbKI ($6,5 \pm 0,1\%$), ACO-Pep-BrTI ($9,3 \pm 2,8\%$) e ACO-DX ($20,0 \pm 3,5\%$) apresentaram reversão dos valores de óxido nítrico exalado, visto que foram diferentes do grupo ACO, e foram semelhantes ao grupo SAL.

Os grupos ACO-Pep-BbKI e ACO-Pep-BrTI apresentaram valores menores do que os dos demais tratamentos (ACO-Pep-3-EcTI e ACO-DX).

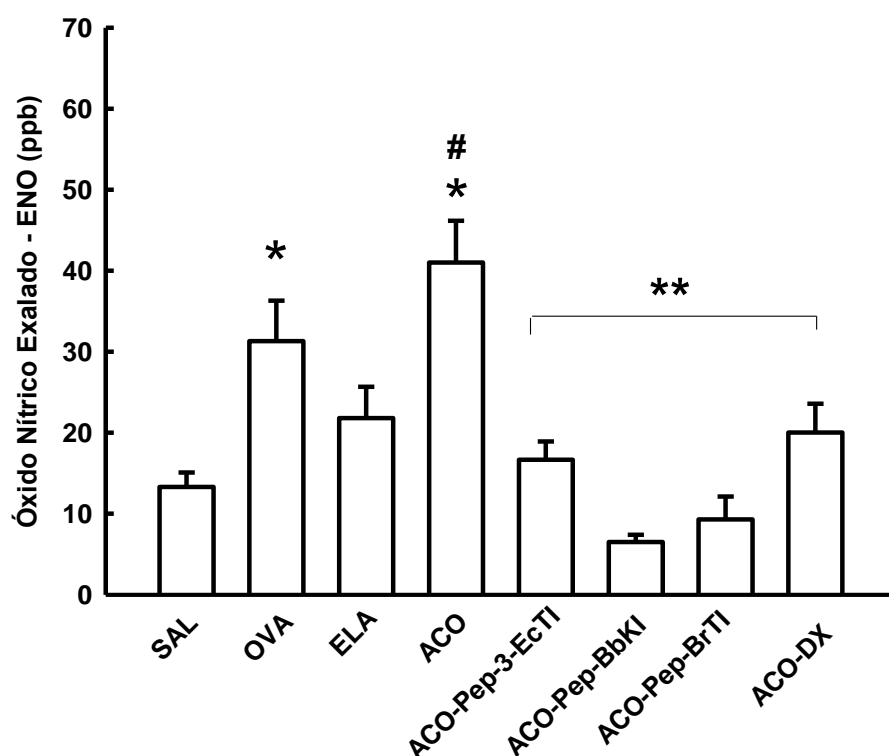


Figura 19. Gráfico da avaliação do NOex nos grupos controle e tratamento; * $p < 0,05$: comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$: comparados ao grupo ACO, # $p < 0,05$: comparados ao grupo ELA e OVA.

4.5 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

4.5.1 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar - Células Diferenciais

As células totais no fluido do lavado broncoalveolar estão demonstradas na *Figura 20*. Ocorreu aumento das células totais no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos OVA ($10,5 \pm 2,7 \cdot 10^4$ células/mL), ELA ($6,4 \pm 0,7 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO ($23,2 \pm 2,9 \cdot 10^4$ células/mL), quando comparados ao grupo SAL ($0,7 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações).

O grupo ACO ($23,2 \pm 2,9 \cdot 10^4$ células/mL) apresentou aumento quando comparado aos grupos OVA ($10,5 \pm 2,7 \cdot 10^4$ células/mL) e ELA ($6,4 \pm 0,7 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações).

Nos animais tratados, os grupos tratamento, ACO-Pep-3-EcTI ($5,4 \pm 1,0 \cdot 10^4$ células/mL), ACO-Pep-BbKI ($9,4 \pm 2,2 \cdot 10^4$ células/mL), ACO-Pep-BrTI ($7,1 \pm 1,5 \cdot 10^4$ células/mL) apresentaram atenuação da resposta pois foi diferente do grupo ACO e diferente do grupo SAL ($23,2 \pm 2,9 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-DX ($2,6 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL) reverteu as alterações sendo diferente do grupo ACO e semelhante ao grupo controle. Não ocorreu diferença entre os grupos tratamento.

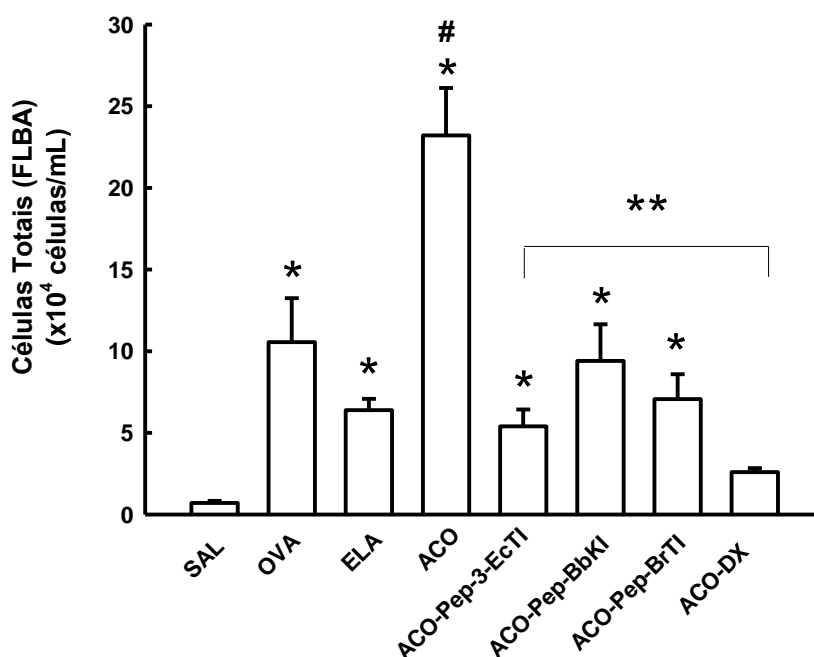


Figura 20. Gráfico das células totais presentes no BALF nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-DX, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI; * $p < 0,05$: comparados ao grupo SAL, ** $p < 0,05$: comparados ao grupo ACO; # $p < 0,05$: comparados aos grupos OVA e ELA.

4.5.2 Neutrófilos

A *Figura 21* demonstra a quantidade de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar. Houve aumento do número de neutrófilos no grupo OVA ($2,5 \pm 0,6 \cdot 10^4$ células/mL), ELA ($1,7 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO ($4,2 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/mL) comparados ao grupo controle SAL ($0,2 \pm 0,03 \cdot 10^4$ células/mL), ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO ($4,2 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/mL) apresentou aumento quando comparado aos grupos OVA ($2,5 \pm 0,6 \cdot 10^4$ células/mL) e ELA ($1,7 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações).

O tratamento dos animais com inibidores de protease ACO-Pep-3-EcTI ($1,4 \pm 0,4 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO-Pep-BrTI ($1,5 \pm 0,4 \cdot 10^4$ células/mL) atenuou essa resposta do número de neutrófilos sendo diferente do grupo ACO ($4,2 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações) e do grupo SAL ($0,2 \pm 0,03 \cdot 10^4$ células/mL). Os grupos ACO-Pep-BbKI ($1,0 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO-DX ($0,6 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL) reverteram totalmente os valores da alteração do número de neutrófilos sendo diferente do grupo ACO e semelhante ao grupo SAL. Não houve diferenças entre os grupos tratamentos.

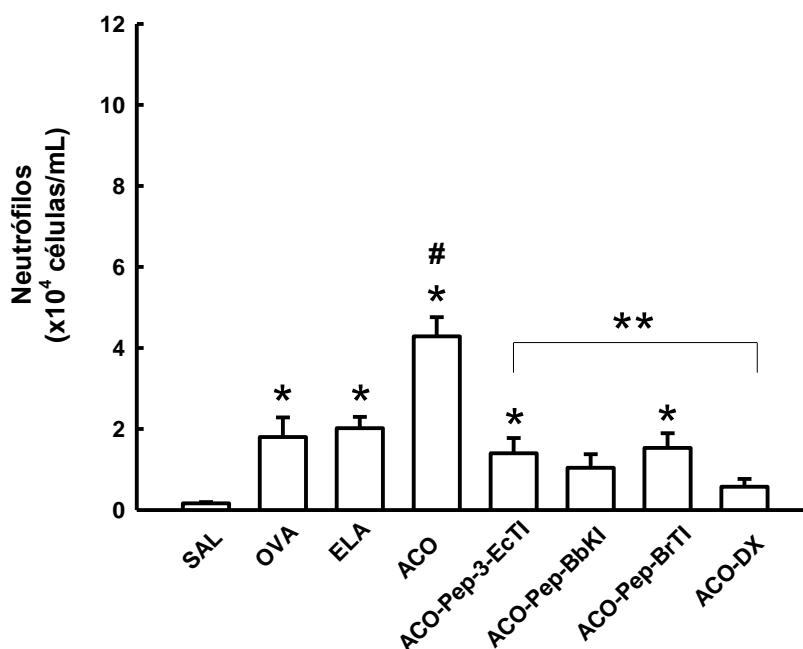


Figura 21. Gráfico demonstra a contagem de neutrófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-DX, ACO-Pep-BbKI e ACO-Pep-BrTI; * $p < 0,05$: comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$: comparados ao grupo ACO; # $p < 0,05$: comparados aos grupos OVA e ELA.

4.5.3 Eosinófilos

A Figura 22 demonstra a quantidade de eosinófilos no lavado broncoalveolar. Houve aumento da quantidade de eosinófilos nos grupos OVA ($4,5 \pm 1,2 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO ($9,5 \pm 1,6 \cdot 10^4$ células/mL), quando comparados ao grupo SAL ($0,2 \pm 0,04 \cdot 10^4$ células/mL). O grupo ACO ($9,5 \pm 1,6 \cdot 10^4$ células/mL) apresentou aumento significativo quando comparado aos grupos OVA ($4,5 \pm 1,2 \cdot 10^4$ células/mL) e ELA ($0,6 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações).

Os grupos tratamentos ACO-Pep-3-EcTI ($1,8 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO-DX ($0,7 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL) reverteram as alterações de eosinófilos, sendo diferente do grupo ACO ($9,5 \pm 1,6 \cdot 10^4$ células/mL) e semelhante do grupo SAL. Já os grupos ACO-Pep-BbKI ($2,9 \pm 0,7 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO-Pep-BrTI ($2,7 \pm 0,8 \cdot 10^4$ células/mL) apresentaram redução da quantidade de eosinófilos quando comparado ao grupo ACO ($9,5 \pm 1,6 \cdot 10^4$ células/mL), porém foram diferentes de SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamento não obtiveram diferença entre si.

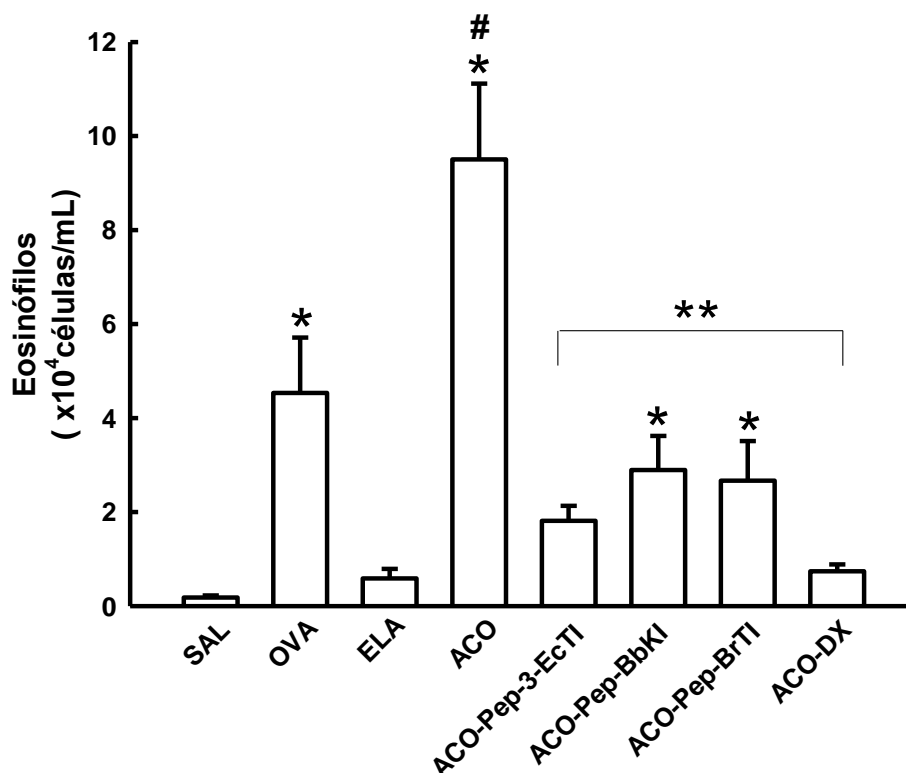


Figura 22. Gráfico demonstra a contagem de eosinófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-DX, ACO-Pep-BbKI e ACO-BrTI; * $p < 0,05$: comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$: comparados ao grupo ACO; # $p < 0,05$: comparados ao grupo OVA e ELA.

4.5.4 Macrófagos

Na **Figura 23** descreve-se a quantidade de macrófagos no fluido do lavado broncoalveolar. Os grupos OVA ($1,9 \pm 0,7 \cdot 10^4$ células/mL), ELA ($3,2 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO ($7,7 \pm 0,9 \cdot 10^4$ células/mL) demonstram um aumento da quantidade de macrófagos comparados ao grupo SAL ($0,2 \pm 0,04 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$). O grupo ACO ($7,7 \pm 0,9 \cdot 10^4$ células/mL) apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo OVA ($1,9 \pm 0,7 \cdot 10^4$ células/mL) e ELA ($3,2 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as comparações).

Os grupos tratamentos ACO-Pep-3-EcTI ($1,7 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL), ACO-Pep-BbKI ($1,8 \pm 0,3 \cdot 10^4$ células/mL), ACO-Pep-BrTI ($1,8 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/mL), apresentaram atenuação sendo diferente do grupo ACO ($7,7 \pm 0,9 \cdot 10^4$ células/mL), e do grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Já o grupo tratamento ACO-DX ($1,0 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL) reverteu totalmente sendo diferente do grupo ACO e semelhante ao grupo SAL. Os grupos tratamento não apresentaram diferenças entre si.

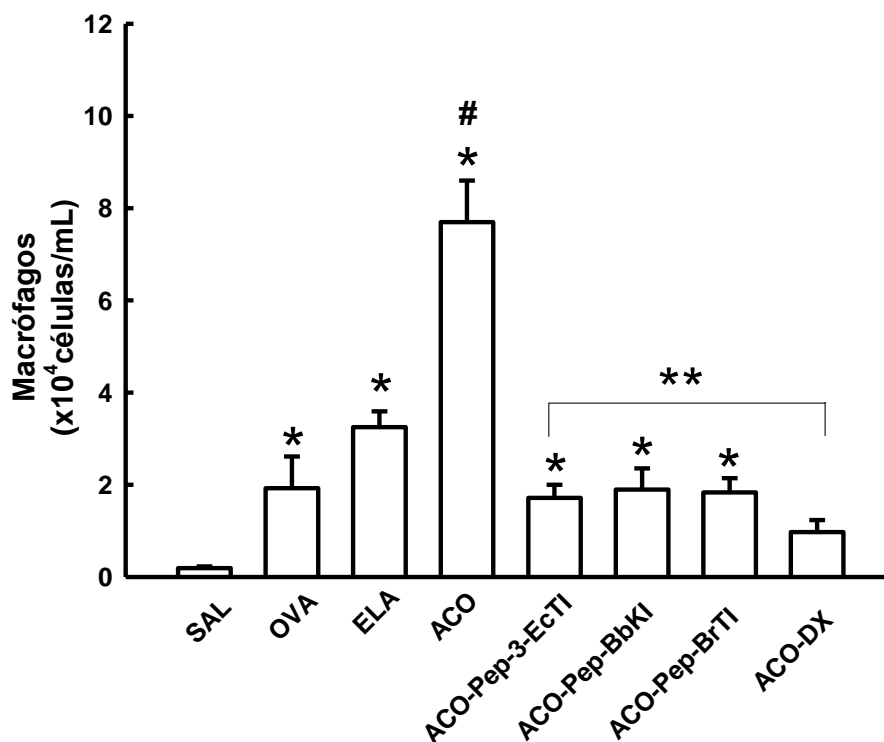


Figura 23. Gráfico demonstra a contagem de macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-DX, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI; * $p < 0,05$: comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$: comparados ao grupo ACO; # $p < 0,05$: comparados ao grupo OVA e ELA.

4.5.5 Linfócitos

A *Figura 24* demonstra a quantidade de linfócitos no lavado broncoalveolar. Houve aumento da quantidade de linfócitos nos grupos OVA ($1,5 \pm 0,4 \cdot 10^4$ células/mL), ELA ($0,8 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO ($1,7 \pm 0,4 \cdot 10^4$ células/mL), quando comparado ao grupo SAL ($0,2 \pm 0,03 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as alterações).

Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($0,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$ células/mL), ACO-DX ($0,3 \pm 0,1 \cdot 10^4$ células/mL), reverteram por completo a quantidade de linfócitos sendo diferente do grupo ACO ($1,7 \pm 0,4 \cdot 10^4$ células/mL) e semelhante ao grupo SAL ($0,2 \pm 0,03 \cdot 10^4$ células/mL) ($p < 0,05$ para todas as alterações),

Os grupos tratamento ACO-Pep-BbKI ($1,0 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/mL) e ACO-Pep-BrTI ($1,0 \pm 0,5 \cdot 10^4$ células/mL) não apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ACO, e não foram diferentes do grupo controle SAL ($p < 0,05$).

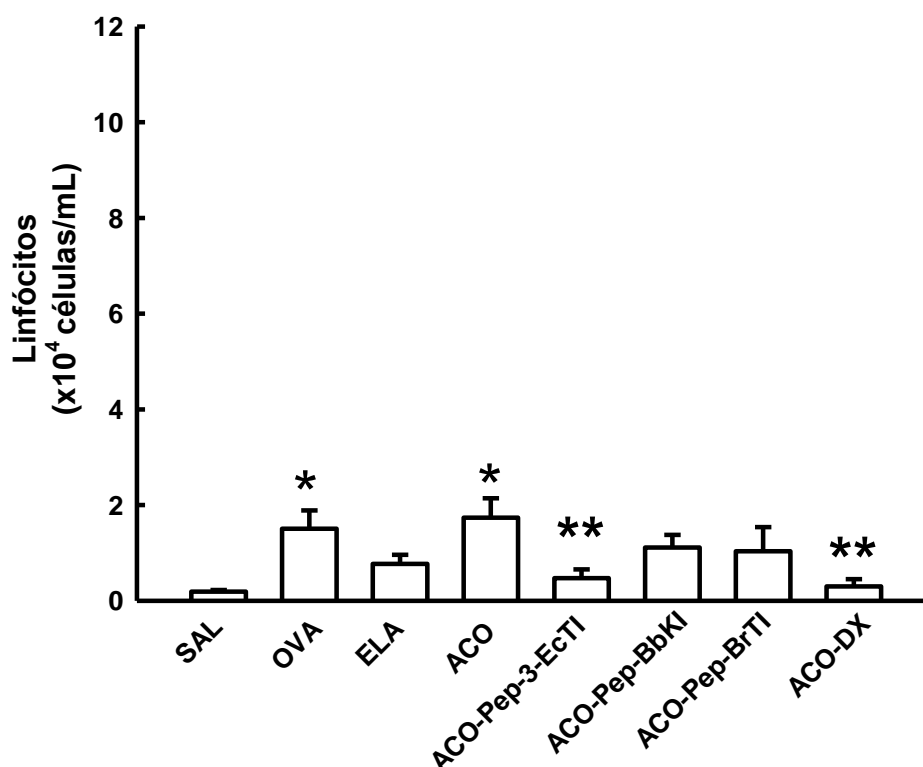


Figura 24. Gráfico demonstra a contagem de linfócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-DX, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI; * $p < 0,05$: comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$: comparados ao grupo ACO.

4.6 Marcadores Inflamatórios

4.6.1 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-1 β nas Vias Aéreas

A *Figura 25* demonstra a contagem de células positivas para IL-1 β nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-PEP-EcTI, ACO-PEP-BbKI, ACO-PEP-BrTI e ACO-DX. Foi observado aumento destas células positivas nos grupos OVA ($4,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($6,1 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,4 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-1 β em relação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($2,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($1,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações do número de células positivas sendo diferente de ACO e SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-DX apresentou maior atenuação na contagem de células positivas para IL-1 β do que os peptídeos ($p < 0,05$).

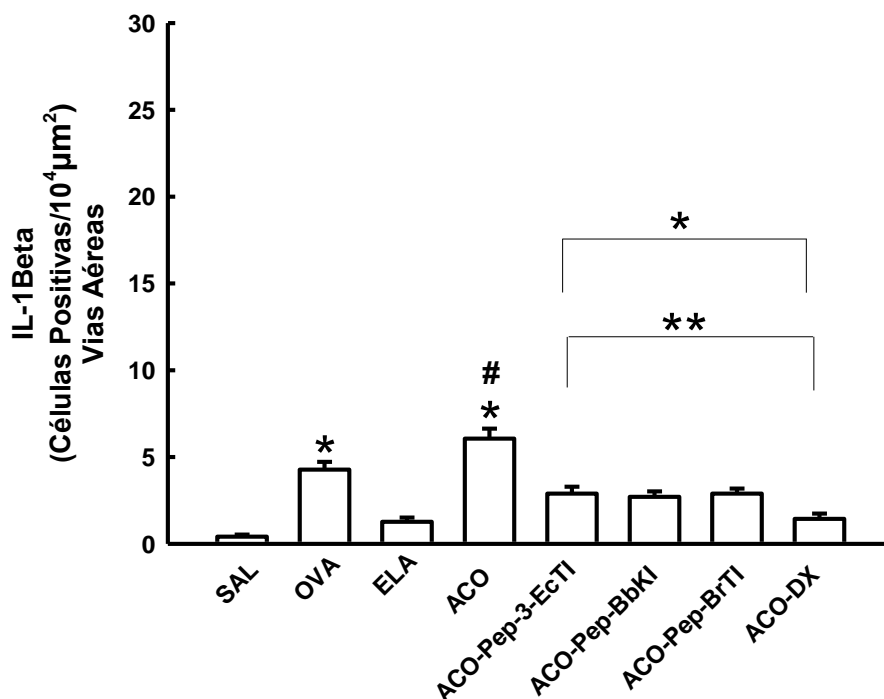


Figura 25. Número de células positivas para IL-1 β (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle e tratamento; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.2 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-1 β nos Septos Alveolares

A Figura 26 demonstra a contagem de células positivas para IL-1 β nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA ($2,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($4,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,4 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-1 β em relação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($1,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($1,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($3,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($0,6 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações em número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ($p < 0,05$ para ambas as comparações), os grupos ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI e ACO-DX reverteram a resposta sendo diferente de ACO e semelhante do grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações), apenas o grupo ACO-Pep-BrTI apresentou-se diferente do SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações).

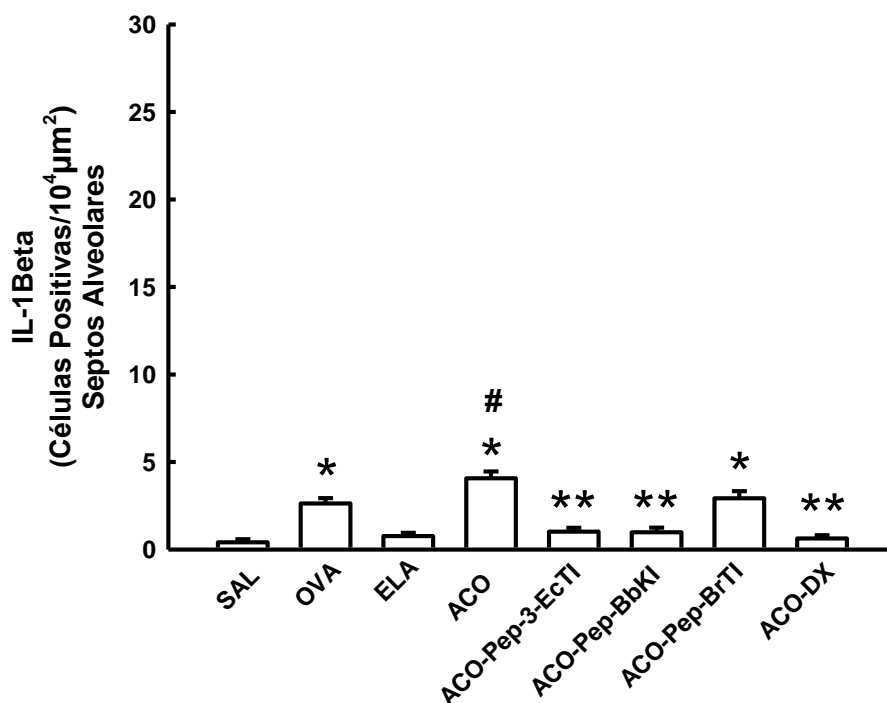


Figura 26. Número de células positivas para IL-1 β (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.3 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-4 nas Vias Aéreas

A Figura 27 demonstra a contagem de células positivas para IL-4 nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA ($11,6 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($12,0 \pm 2,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($1,6 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($6,8 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($11,9 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($9,2 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($7,5 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) não apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ACO ($p < 0,05$ para todas as comparações).

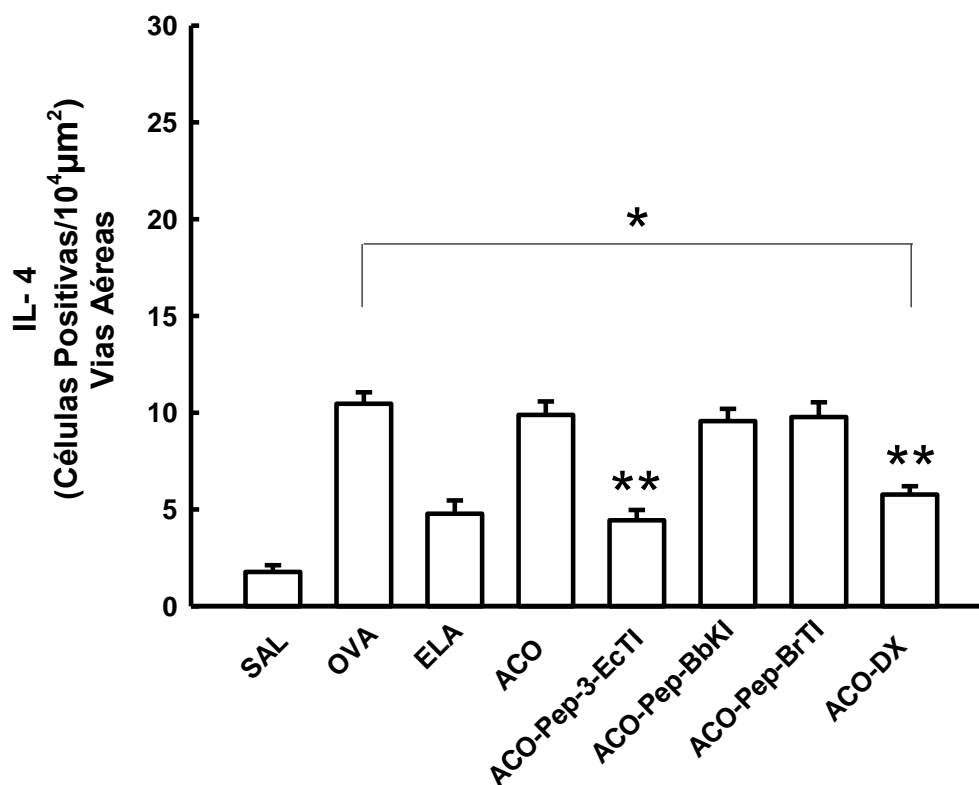


Figura 27. Número de células positivas para IL-4 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo ACO.

4.6.4 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-4 nos Septos Alveolares

A Figura 28 demonstra a contagem de células positivas para IL-4 nos septos alveolares nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA ($10,5 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($4,8 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($9,9 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($1,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($4,4 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($5,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram atenuação da resposta sendo diferente de ACO e SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-BbKI ($9,6 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-Pep-BrTI ($9,8 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) não apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ACO ($p < 0,05$ para todas as comparações).

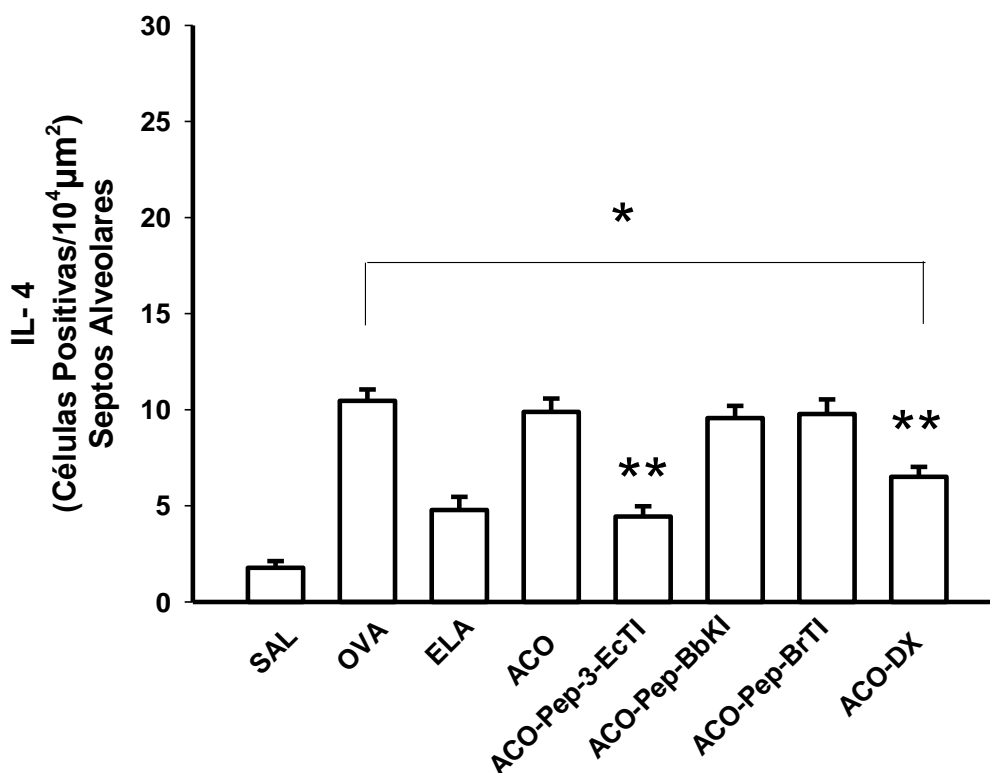


Figura 28. Número de células positivas para IL-4 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.5 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-5 nas Vias Aéreas

A Figura 29 demonstra a contagem de células positivas para IL-5 nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA ($11,4 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($6,5 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($8,6 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($1,5 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO apresentou menor expressão de células positivas para IL-5 do que o grupo OVA ($p < 0,05$) e apresentou maior expressão quando comparado ao grupo ELA ($p < 0,05$). Os grupos tratamento com peptídeos BbKI ($2,4 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e BrTI ($1,8 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), reverteram as alterações do número de células positivas sendo diferente de ACO e semelhante de SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-DX ($5,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-Pep-3-EcTI ($3,8 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram a resposta sendo diferente de ACO e SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Entre os grupos tratamento, os tratamentos com peptídeos (EcTI, BbKI e BrTI) foram diferentes do grupo ACO-DX ($p < 0,05$ para todas as comparações).

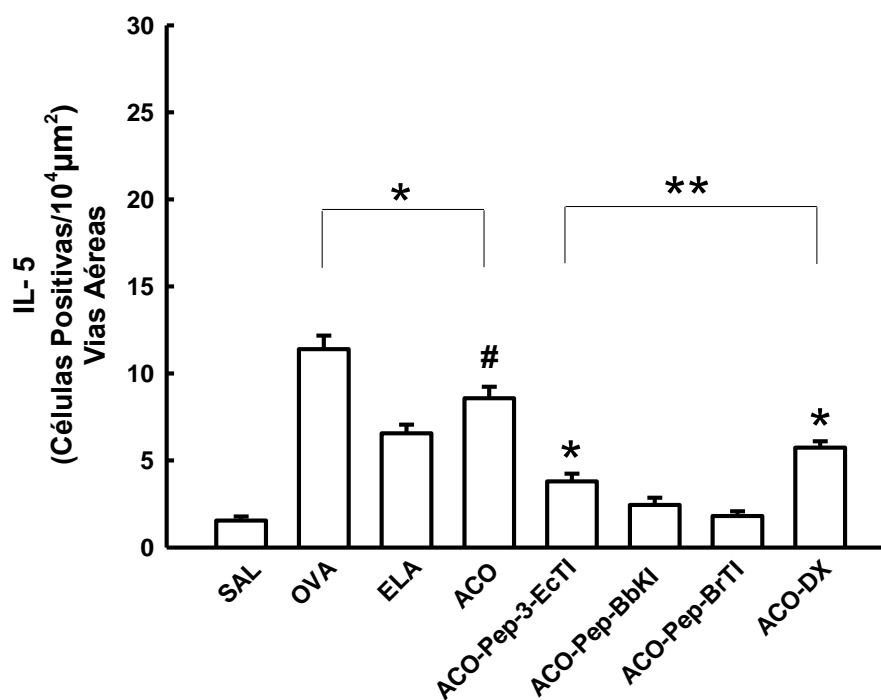


Figura 29. Número de células positivas para IL-5 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.6 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-5 nos Septos Alveolares

Na *Figura 30* temos a contagem de células positivas para IL-5 nos septos alveolares nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve um aumento destas células positivas nos grupos OVA ($4,4 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($2,9 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($8,0 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($1,2 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). ACO foi maior que OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações) na expressão de células positivas para IL-5. Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($1,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($1,3 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteram totalmente as alterações em número de células positivas sendo diferente de ACO e semelhante a SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações).

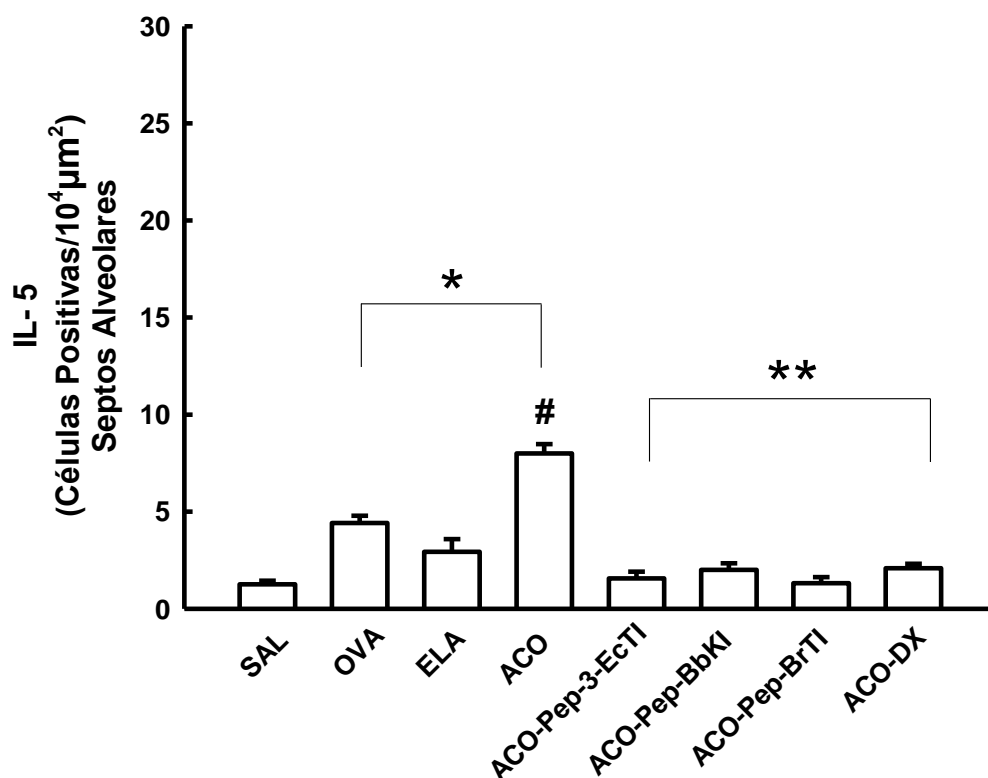


Figura 30. Número de células positivas para IL-5 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.7 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-6 nas Vias Aéreas

A Figura 31 mostra a avaliação do número de células positivas para IL-6 nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento na expressão destas células em todos os grupos OVA ($6,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($7,2 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($12,3 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) comparados ao grupo SAL ($0,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-6 em comparação ao grupo ELA e OVA ($p < 0,05$). Os grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($1,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($1,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($1,1 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações destas células positivas para IL-6 sendo diferente de ACO e SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX reverteram totalmente sendo diferente de ACO e semelhante a SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações).

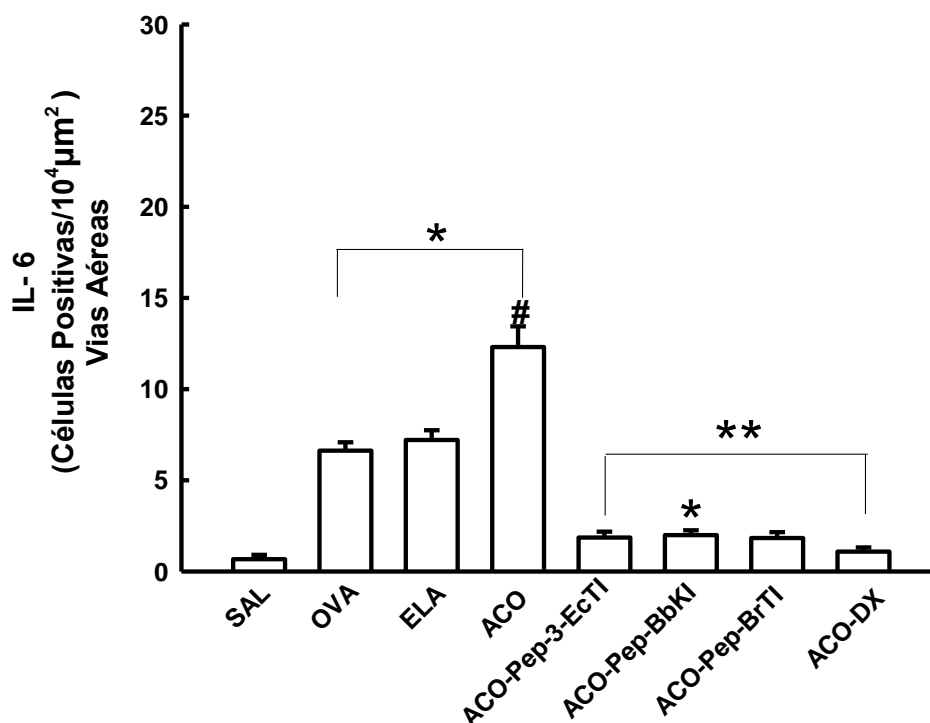


Figura 31. Número de células positivas para IL-6 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.8 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-6 nos Septos Alveolares

A Figura 32 mostra a avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células nos grupos OVA ($6,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($7,2 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($12,3 \pm 1,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo SAL ($0,5 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO apresentou maior contagem de células positivas para IL-6 em comparação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo tratado com dexametasona, ACO-DX ($1,1 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteu totalmente as alterações sendo diferente de ACO e semelhante a SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamento com peptídeos atenuaram estas alterações sendo diferente tanto do grupo ACO quanto do grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Não teve diferença significativa entre os grupos tratamentos ($p < 0,05$ para todas as comparações).

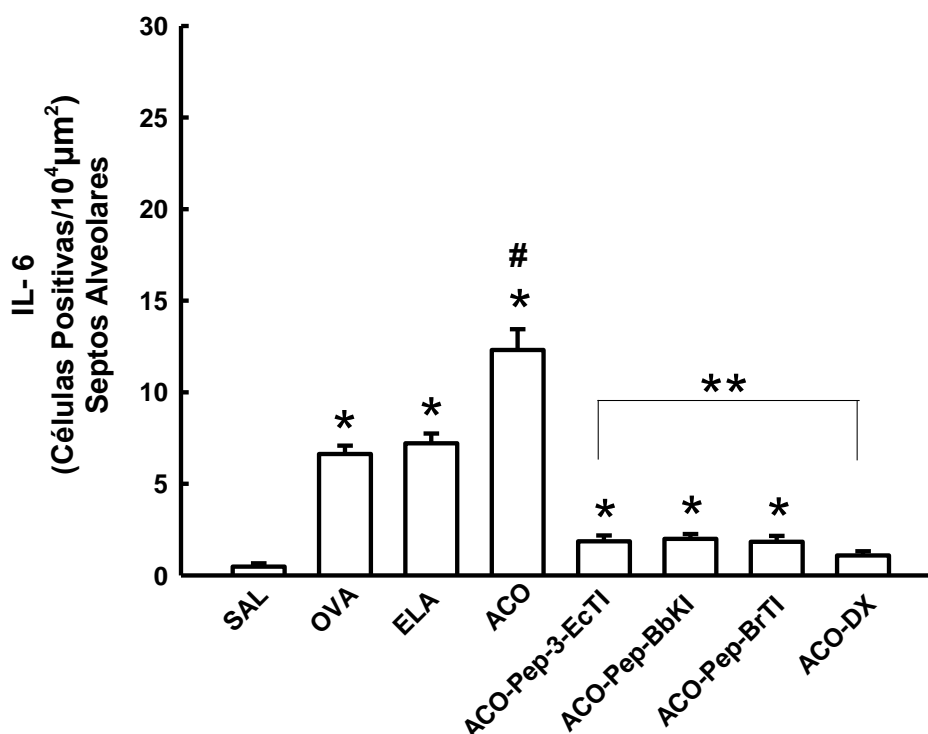


Figura 32. Número de células positivas para IL-6 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.9 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-10 nas Vias Aéreas

A Figura 33 demonstra a contagem de células positivas para IL-10 nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos um aumento da expressão destas células positivas nos grupos OVA ($3,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($4,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($5,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo controle SAL ($2,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). O grupo ACO foi superior em células positivas para IL-10 quando comparado ao grupo OVA e ELA ($p < 0,05$). Os grupos tratados com peptídeos mostraram resposta com reversão total das alterações sendo diferentes do grupo ACO e semelhantes ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-DX ($4,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentou atenuação, sendo diferente tanto do grupo ACO quanto do grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) foram diferentes do grupo ACO-DX ($4,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações) com menor contagem de células positivas para IL-10.

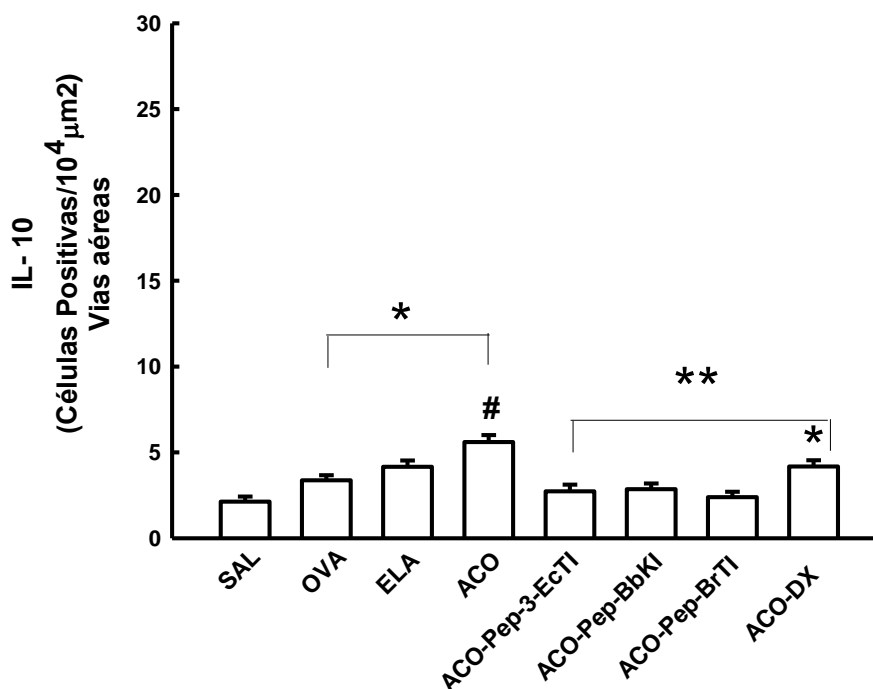


Figura 33. Número de células positivas para IL-10 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.10 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-10 nos Septos Alveolares

A *Figura 34* demonstra a contagem de células positivas para IL-10 nos septos alveolares nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve um aumento da destas células positivas para IL-10 nos grupos OVA ($4,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($5,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($6,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo controle SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO apresentou aumento quando comparado a OVA ($p < 0,05$). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($4,0 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($3,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram reversão completa, sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações).

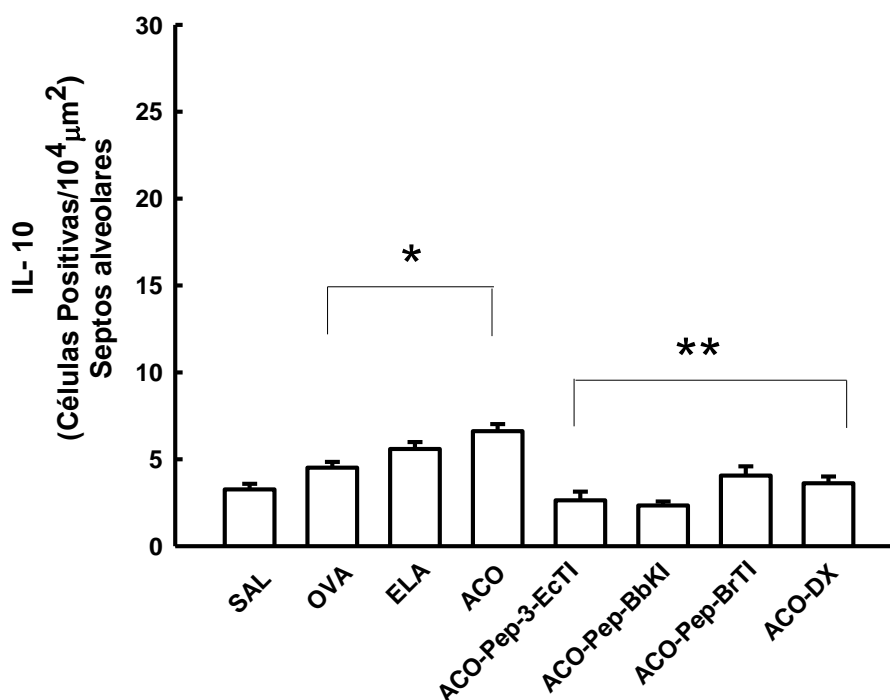


Figura 34. Número de células positivas para IL-10 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) no alveolar septa dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.11 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-13 nas Vias Aéreas

A Figura 35 demonstra a contagem de células positivas para IL-13 nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento das células positivas nos grupos OVA ($11,1 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($7,9 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($11,6 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($2,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ELA apresentou menor expressão de células positivas para IL-13 do que os grupos OVA e ACO ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($8,1 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($7,0 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($7,2 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($7,4 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações sendo diferente do grupo ACO e do grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos tratamento não foram diferentes entre si.

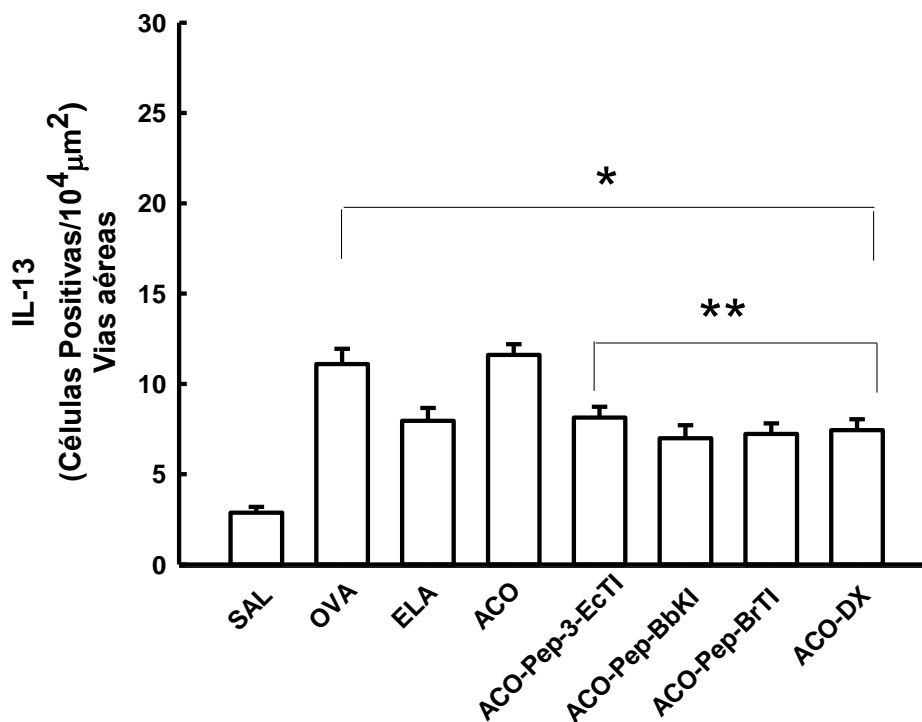


Figura 35. Número de células positivas para IL-13 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.6.12 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-13 nos Septos Alveolares

A *Figura 36* demonstra a contagem de células positivas para IL-13 nos septos alveolares nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA ($9,1 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($6,7 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($17,9 \pm 1,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($3,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-13 do que os grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($3,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($4,5 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($3,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($4,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram total reversão, sendo diferente do grupo ACO e semelhante ao grupo SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

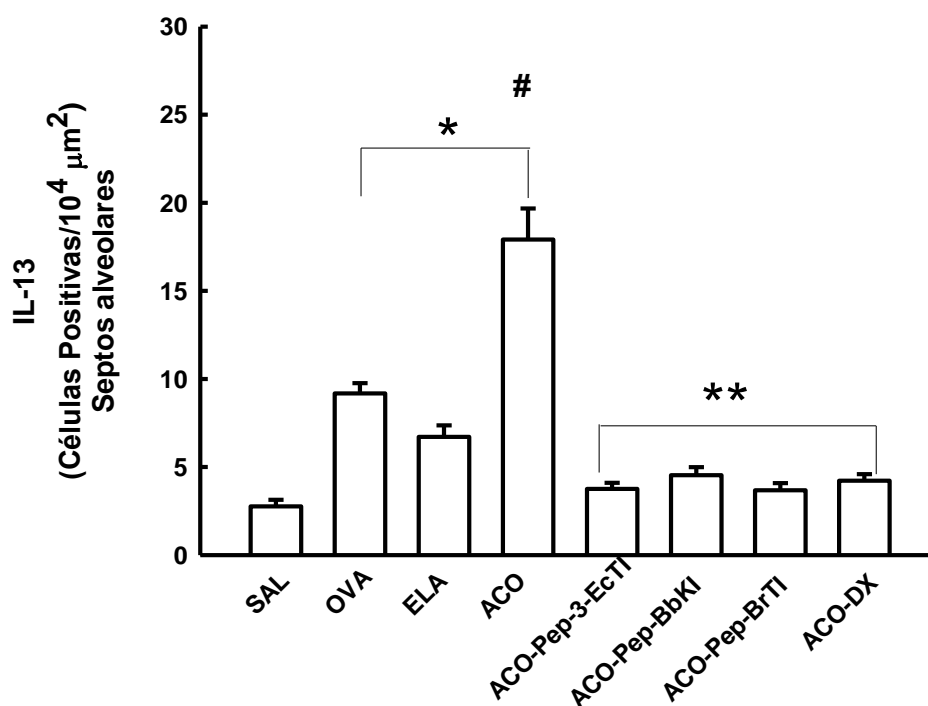


Figura 36. Número de células positivas para IL-13 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.13 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-17 nas Vias Aéreas

A *Figura 37* demonstra a contagem de células positivas para IL-17 nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA ($5,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($6,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($7,3 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de células positivas para IL-17 do que o grupo OVA ($p < 0,05$). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($3,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteu totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante a SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO-DX ($4,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou as alterações, sendo diferente de ACO e SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

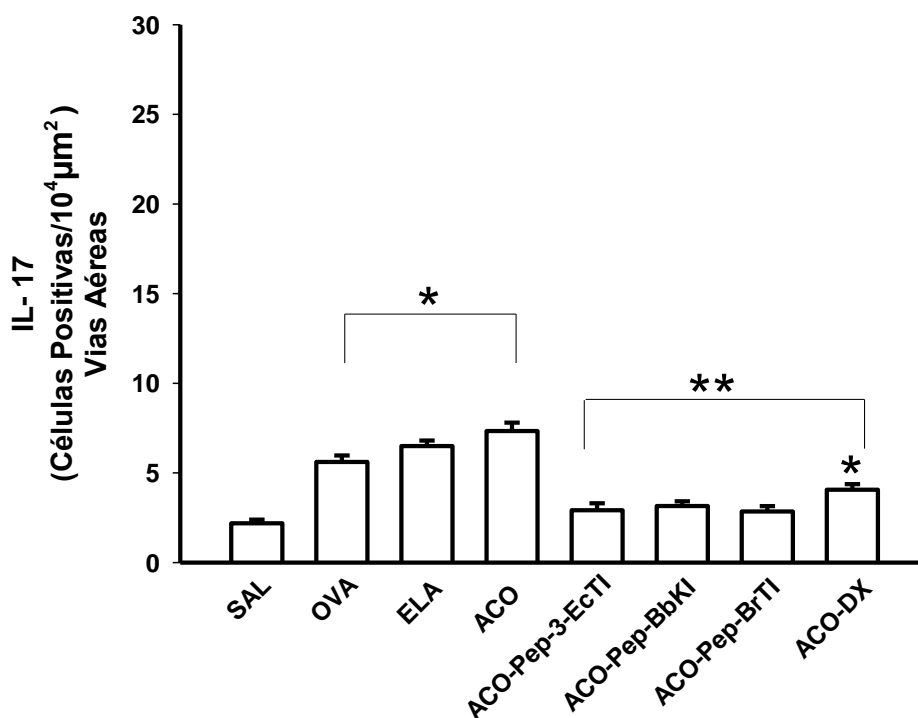


Figura 37. Número de células positivas para IL-17 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.14 Avaliação do Número de Células Positivas para IL-17 nos Septos Alveolares

A *Figura 38* demonstra a contagem de células positivas para IL-17 nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA ($6,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($8,1 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($8,4 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($1,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de células positivas para IL-17 do que o grupo OVA ($p < 0,05$). O grupo tratamento ACO-Pep-BbKI ($2,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteu totalmente as alterações sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos tratados tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($4,6 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($3,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($4,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações, sendo diferente do grupo ACO e do grupo SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

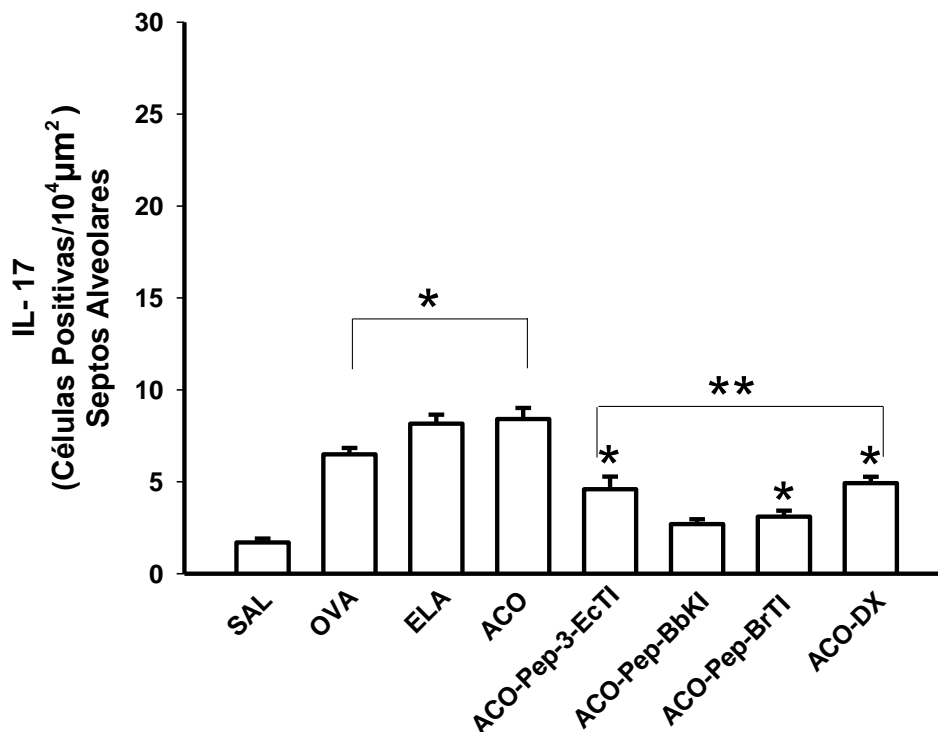


Figura 38. Número de células positivas para IL-17 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.15 Avaliação do Número de Células Positivas para IFN- γ nas Vias Aéreas

A Figura 39 demonstra a contagem de células positivas para IFN- γ nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Foi observado aumento destas células positivas nos grupos ELA ($3,4 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($6,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IFN- γ em relação aos grupos OVA ($2,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($1,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($1,1 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($0,3 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteram totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO-Pep-BrTI ($2,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou a resposta, sendo diferente de ACO e SAL ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Na comparação entre os grupos tratamentos, ACO-DX mostrou menor contagem de células positivas para IFN- γ do que os grupos tratados com peptídeos de plantas ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

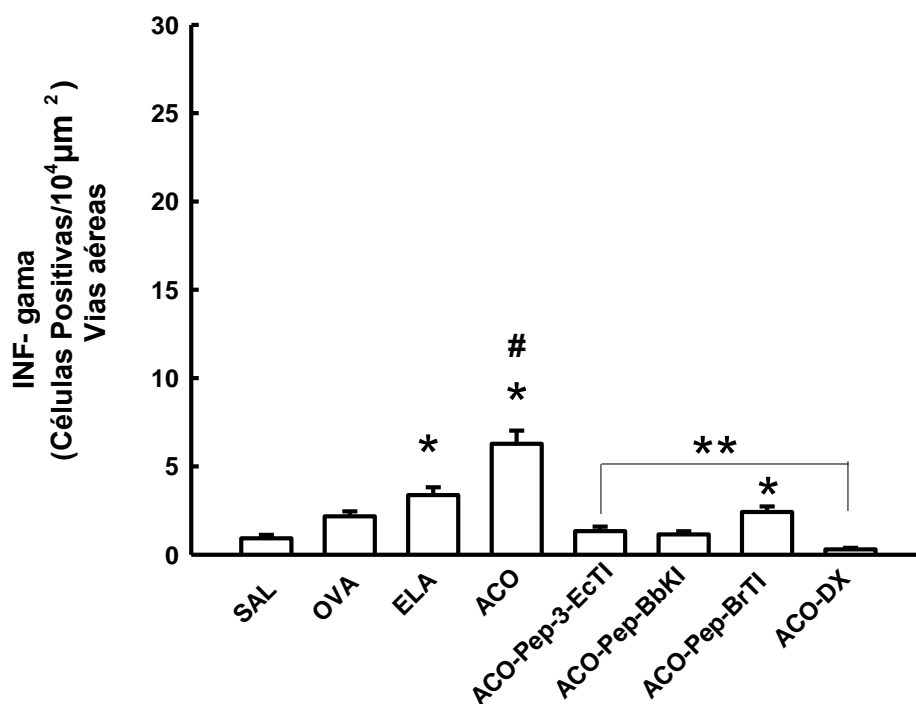


Figura 39. Número de células positivas para IFN- γ (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.16 Avaliação do Número de Células Positivas para IFN- γ nos Septos Alveolares

A *Figura 40* demonstra a contagem de células positivas para IFN- γ nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA ($2,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($2,5 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($3,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($0,5 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($1,2 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($0,7 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteram totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-Pep-BrTI ($2,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) não apresentou redução estatisticamente significativa quando comparado a ACO e ele também foi diferente de SAL.

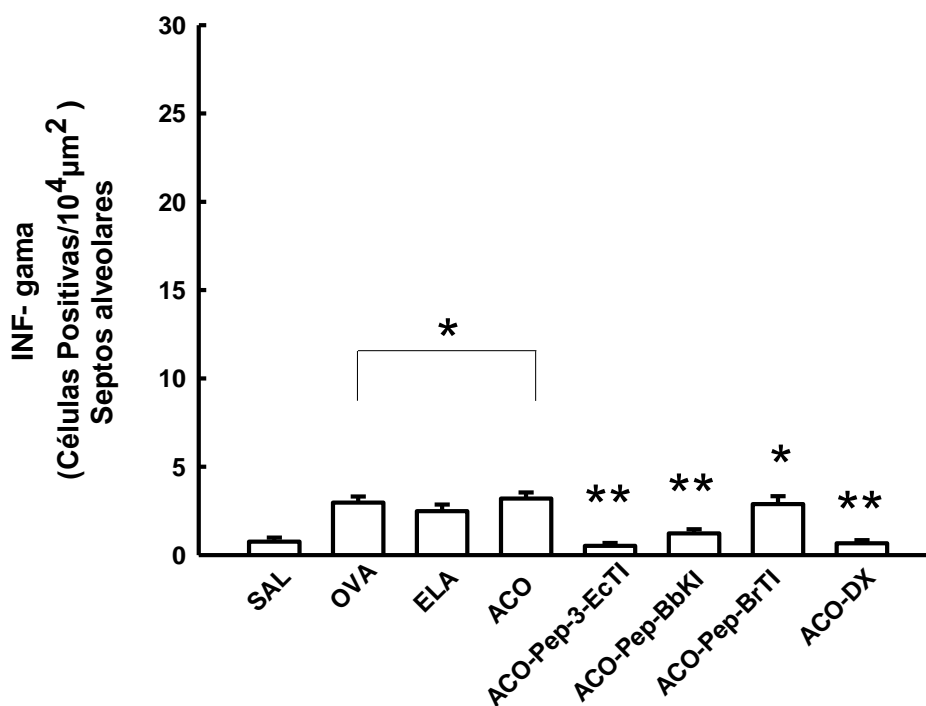


Figura 40. Número de células positivas para IFN- γ (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.17 Avaliação do Número de Células Positivas para TNF- α nas Vias Aéreas

A *Figura 41* demonstra a contagem de células positivas para TNF- α nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos que os grupos OVA ($6,2 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($5,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($4,9 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram maior número de células positivas comparadas ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO não foi diferente de OVA e ELA ($p > 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($4,2 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($4,8 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($4,2 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) não foram diferentes do grupo ACO ($p > 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-Pep-BbKI ($2,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentou reversão total sendo diferente de ACO e semelhante ao SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

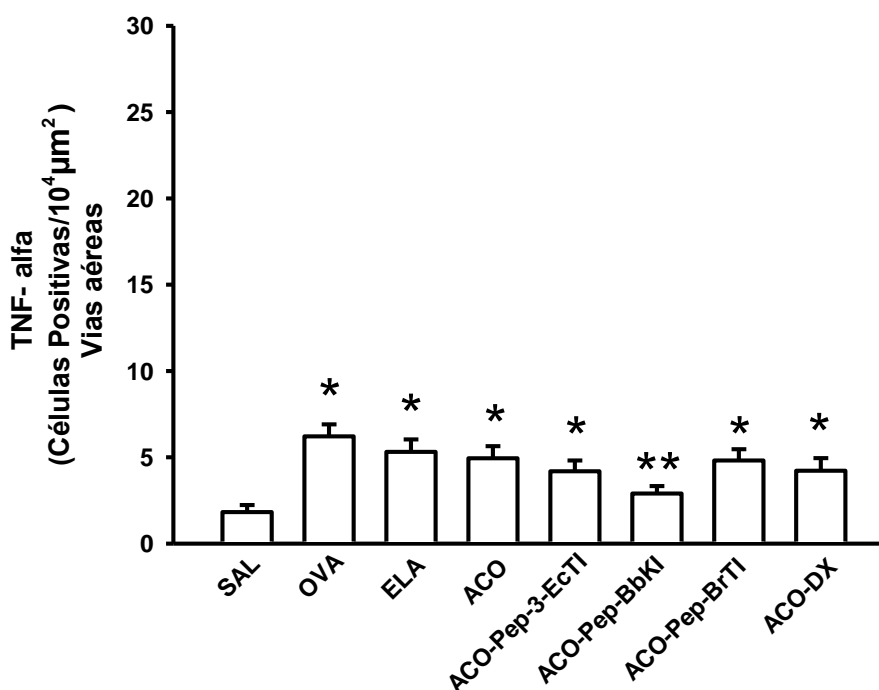


Figura 41. Número de células positivas para TNF- α (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.6.18 Avaliação do Número de Células Positivas para TNF- α nos Septos Alveolares

Na *Figura 42* encontramos a contagem de células positivas para TNF- α nos septos alveolares nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA ($5,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($6,2 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($9,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), quando comparados ao grupo SAL ($1,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO foi superior ao grupo OVA e ELA na expressão de TNF- α ($p < 0,05$). Houve reversão total das alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações), no grupo tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($2,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). O grupo ACO-DX ($3,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou a alteração, sendo diferente de ACO e SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). Entre os grupos tratamento, o grupo ACO-DX foi diferente de ACO-Pep-EcTI e ACO-Pep-BbKI ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

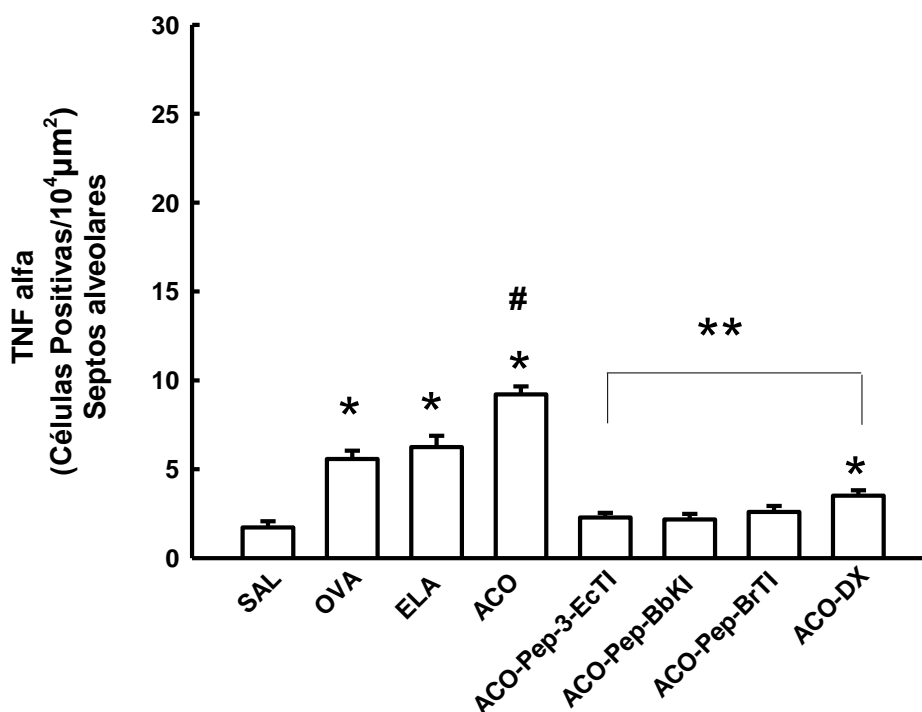


Figura 42. Número de células positivas para TNF- α (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA e ELA; ** $p < 0,05$ quando comparados ao grupo ACO.

4.8 Marcadores de Remodelamento

4.8.1 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-9 nas Vias Aéreas

A *Figura 43* demonstra a contagem de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-PEP-EcTI, ACO-PEP-BbKI, ACO-PEP-BrTI e ACO-DX. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA ($3,1 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($5,4 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO ($10,3 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), quando comparados ao grupo SAL ($0,3 \pm 0,04$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). O grupo ACO apresentou maior expressão de células positivas para MMP-9 em relação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,4 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($1,9 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,2 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,1 \pm 0,08$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações, sendo diferente de ACO e SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações).

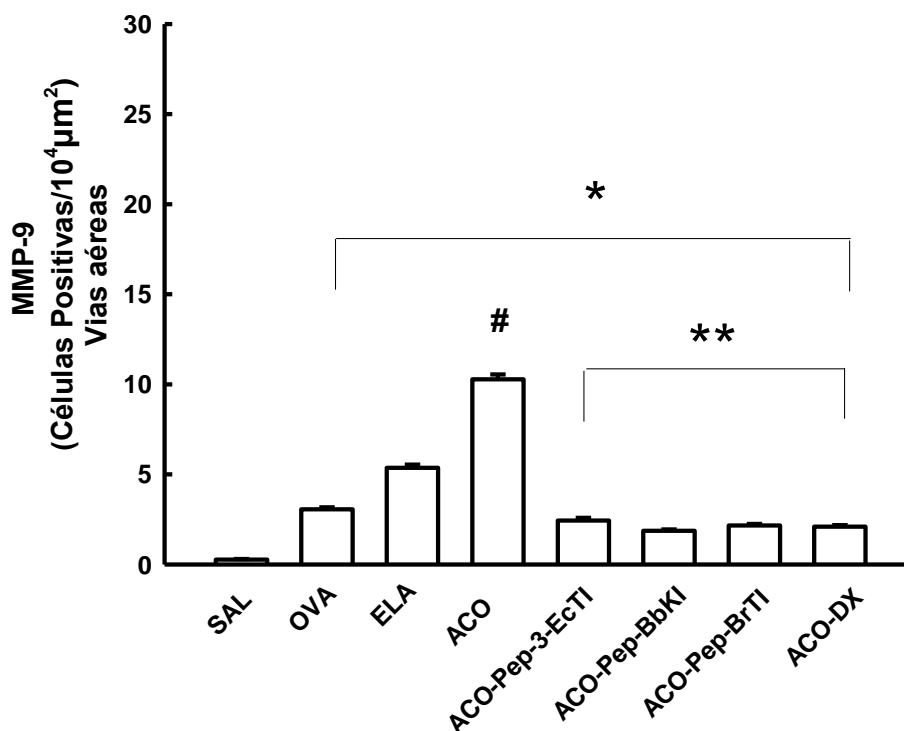


Figura 43. Número de células positivas para MMP-9 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.2 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-9 nos Septos Alveolares

A Figura 44 demonstra a contagem de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares nos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA ($2,1 \pm 0,09$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($4,4 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($8,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,9 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). O grupo ACO apresentou maior expressão em células positivas para MMP-9 em relação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($1,9 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($1,8 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,4 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações, sendo diferente de ACO e de SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações).

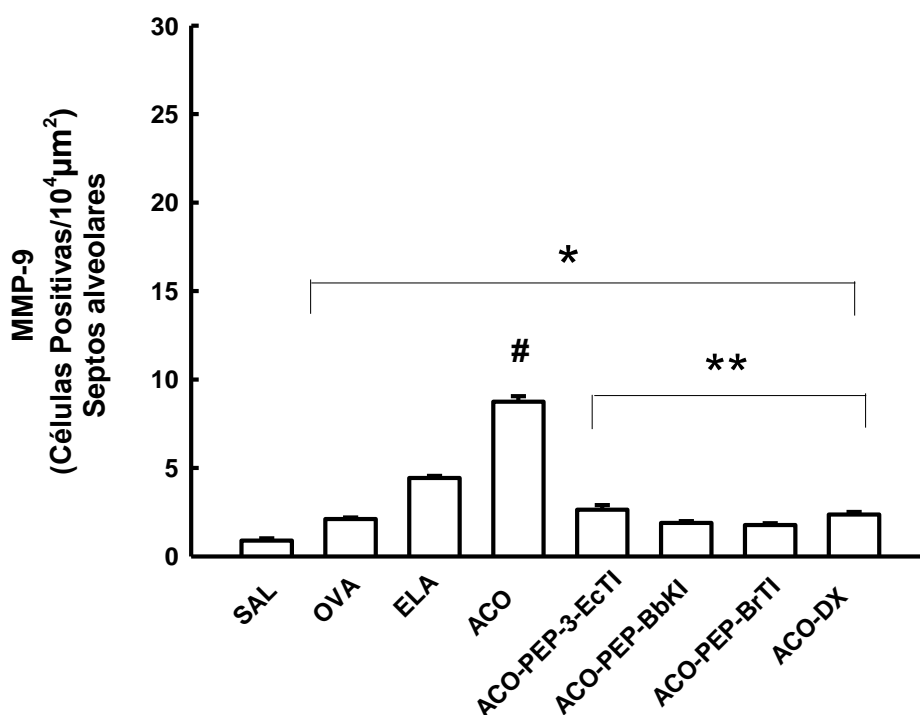


Figura 44. Número de células positivas para MMP-9 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.3 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-12 nas Vias Aéreas

A *Figura 45* demonstra a contagem de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas no grupo ACO quando comparado ao grupo SAL ($1,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$). O grupo ACO ($3,5 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentou maior expressão de MMP-12 em relação aos grupos OVA ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ELA ($2,1 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-BbKI ($1,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($0,9 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteram totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-Pep-3-EcTI ($3,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) não teve atenuação significativa comparada ao grupo ACO. Na comparação entre os grupos tratamentos, ACO-DX mostraram menor contagem de células positivas para MMP-12 quando comparado com o grupo ACO-Pep-BrTI e ACO-Pep-3-EcTI ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

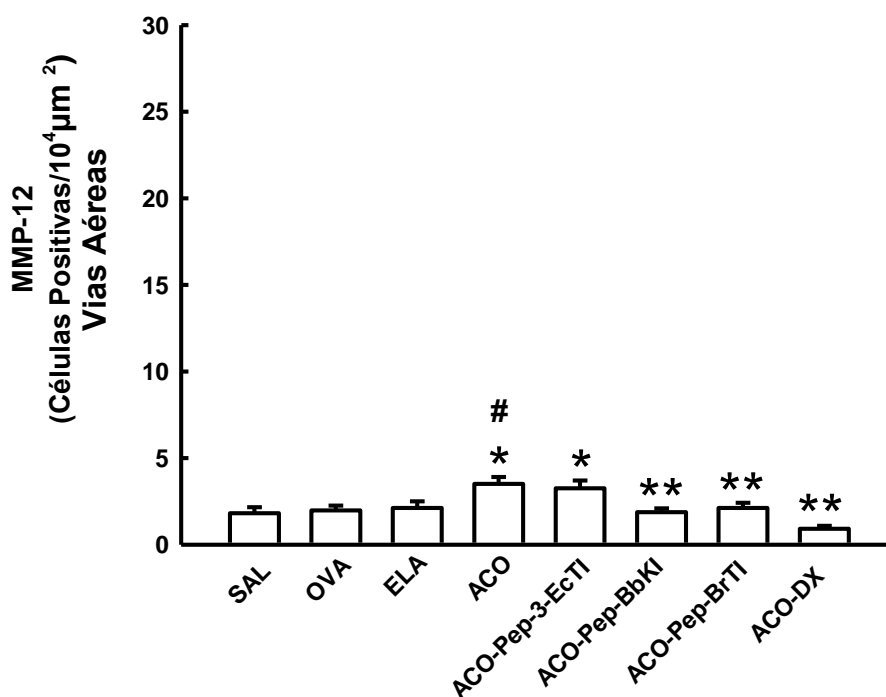


Figura 45. Número de células positivas para MMP-12 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.4 Avaliação do Número de Células Positivas para MMP-12 nos Septos Alveolares

A *Figura 46* demonstra a contagem de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células positivas nos grupos ELA ($2,7 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($5,7 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($0,6 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de MMP-12 em relação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,3 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($4,3 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações, sendo diferentes de ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

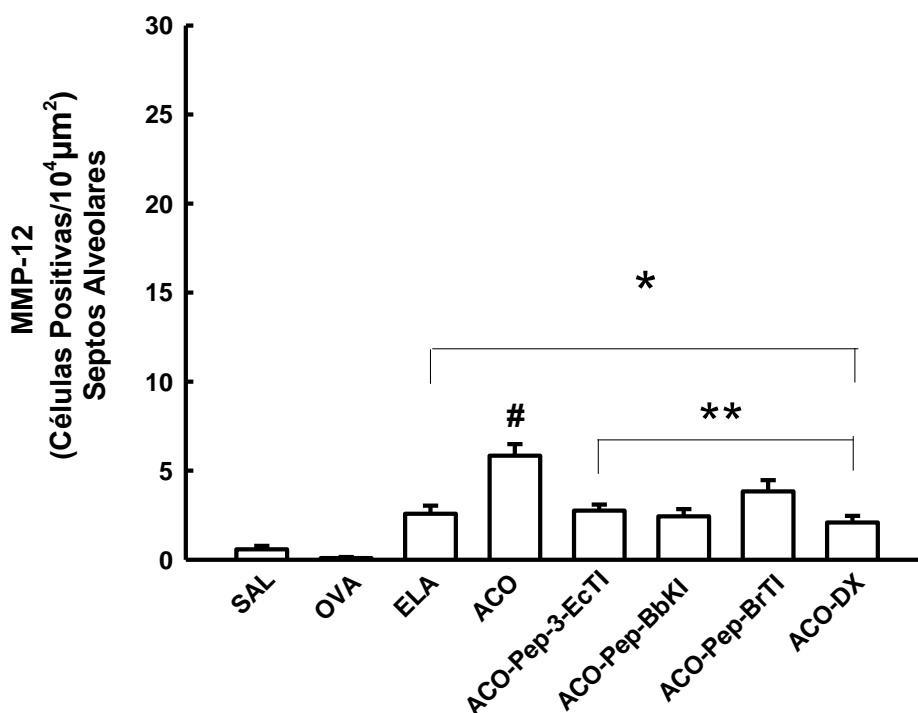


Figura 46. Número de células positivas para MMP-12 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.5 Avaliação do Número de Células Positivas para TGF- β nas Vias Aéreas

A *Figura 47* mostra a avaliação do número de células positivas TGF- β nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento destas células nos grupos experimentais OVA ($5,5 \pm 1,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($7,4 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($1,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior contagem de células positivas para TGF- β em comparação ao grupo ELA ($p < 0,05$). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($4,3 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($4,0 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($4,2 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($3,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações com diminuição de TGF- β comparados ao grupo ACO ($p < 0,05$ para ambas as comparações), visto que estes grupos tratamento foram diferentes de SAL ($p < 0,05$).

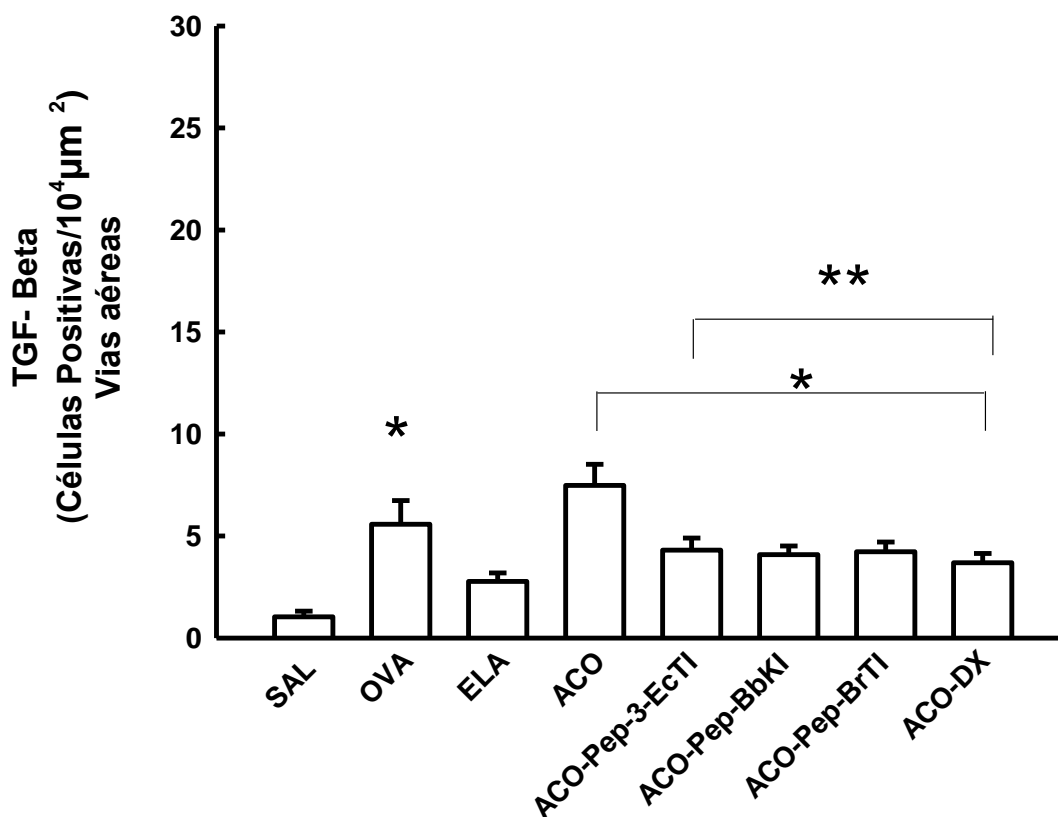


Figura 47. Número de células positivas para TGF- β (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.6 Avaliação do Número de Células Positivas para TGF- β nos Septos Alveolares

A *Figura 48* mostra a avaliação do número de células positivas para TGF- β nos septos alveolares dos grupos controle SAL ($1,8 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), OVA ($4,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($3,0 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO ($9,9 \pm 2,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($2,4 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($0,9 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Observamos aumento destas células no grupo ACO quando comparados ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO apresentou maior contagem de células positivas para TGF- β em comparação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Os grupos ACO-PEP-EcTI, ACO-PEP-BbKI e ACO-PEP-BrTI atenuaram as alterações, sendo diferente de ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-DX reverteu totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

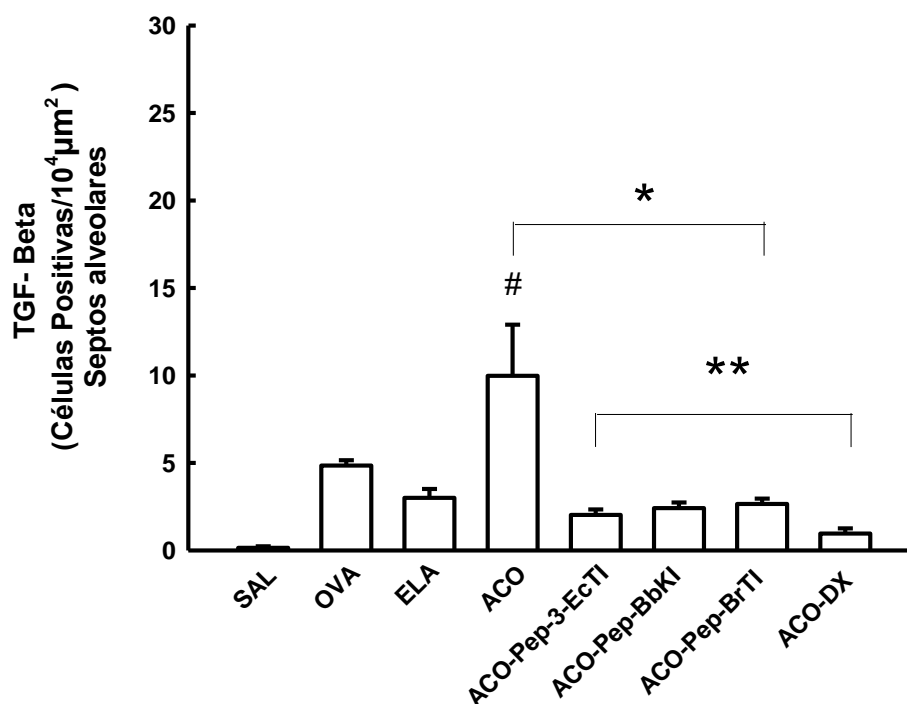


Figura 48. Número de células positivas para TGF- β (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; # $p < 0,05$ quando comparados aos grupos OVA e ELA; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.7 Avaliação da Porcentagem de Fibras Colágenas nas Vias Aéreas

A *Figura 49* mostra a avaliação das fibras colágenas nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento nos grupos OVA ($12,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($12,0 \pm 1,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo SAL ($1,6 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo ACO foi diferente do grupo ELA ($p < 0,05$). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($1,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($1,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($0,2 \pm 0,1$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($1,4 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteram totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

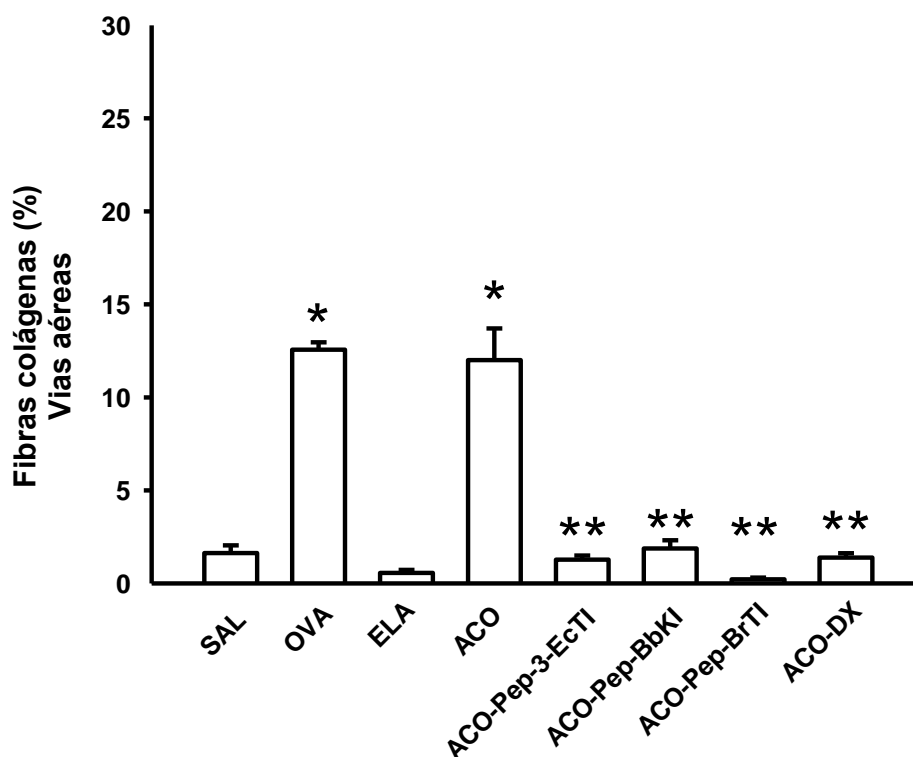


Figura 49. Avaliação da porcentagem de fibras colágenas (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos controle SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.8.8 Avaliação da Porcentagem de Fibras Colágenas nos Septos Alveolares

A Figura 50 mostra a avaliação das fibras colágenas nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Observamos aumento do grupo OVA ($19,9 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($5,3 \pm 0,7$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($8,6 \pm 1,0$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo SAL ($2,4 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). O grupo OVA apresentou aumento da porcentagem de fibras colágenas comparado ao grupo ELA e ACO ($p < 0,05$). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($3,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) reverteram totalmente as alterações, sendo diferente de ACO e semelhante ao grupo SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações). O grupo ACO-DX ($5,8 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuou as alterações de fibras colágenas, sendo diferente do grupo ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

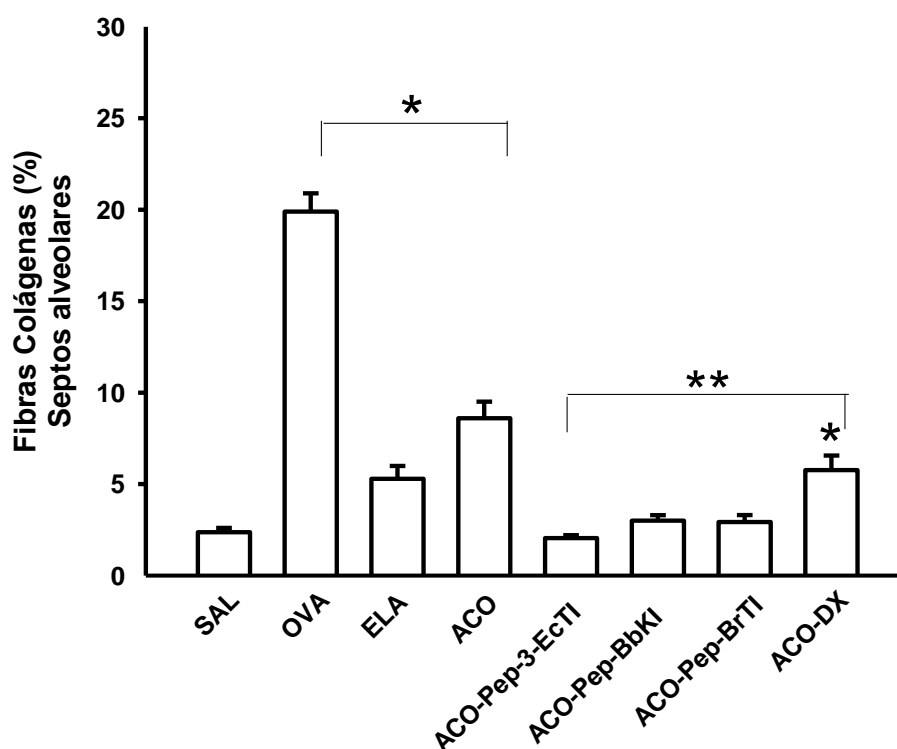


Figura 50. Valores em porcentagem de fibras colágenas (%) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.9 Marcadores do Estresse Oxidativo

4.9.1 Avaliação do Número de Células Positivas para iNOS nas Vias Aéreas

A *Figura 51* demonstra a contagem de células positivas para iNOS nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA ($9,9 \pm 1,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($11,8 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($8,6 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($2,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). Houve reversão total das alterações, onde os resultados apresentam-se diferentes de ACO e semelhante ao SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações), nos grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,6 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($3,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$). Já os grupos ACO-Pep-BbKI ($4,5 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($4,7 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram atenuação dos valores, sendo diferente de ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

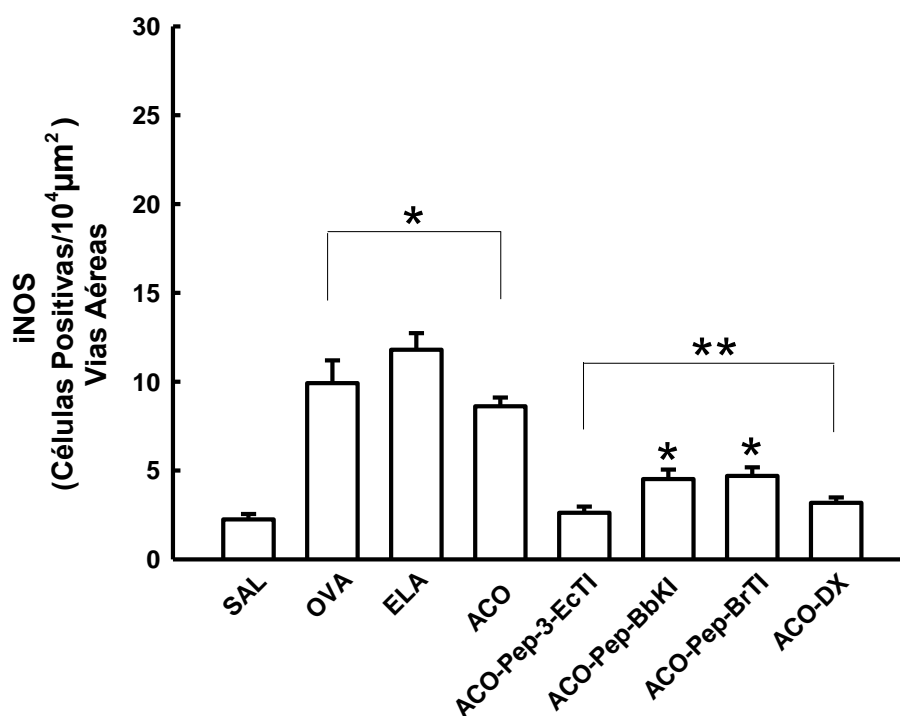


Figura 51. Número de células positivas para iNOS (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.9.2 Avaliação do Número de Células Positivas para iNOS nos Septos Alveolares

Na *Figura 52* observamos a contagem de células positivas para iNOS nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX. Houve diferença no número destas células nos grupos OVA ($8,7 \pm 0,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($9,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($9,9 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($2,2 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$ para todas as comparações). Houve reversão total das alterações, sendo diferente de ACO e semelhante de SAL, nos grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,1 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,8 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) ($p > 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-BbKI ($4,3 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-Pep-BrTI ($4,3 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram os valores, sendo diferentes de ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

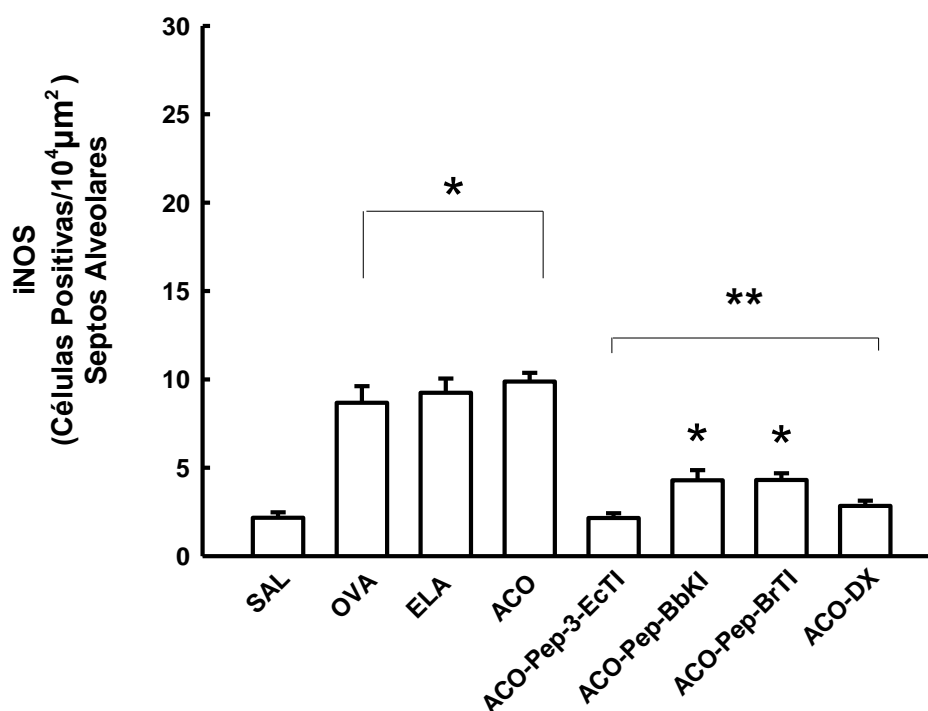


Figura 52. Número de células positivas para iNOS (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.10 Fator de Transcrição

4.10.1 Avaliação do Número de Células Positivas para NF-KappaB nas Vias Aéreas

A *Figura 53* mostra a avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI, ACO-DX. Observamos aumento destas células nos grupos OVA ($6,7 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($8,6 \pm 0,8$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($6,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,5 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($4,1 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,5 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,3 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações, sendo diferente de ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

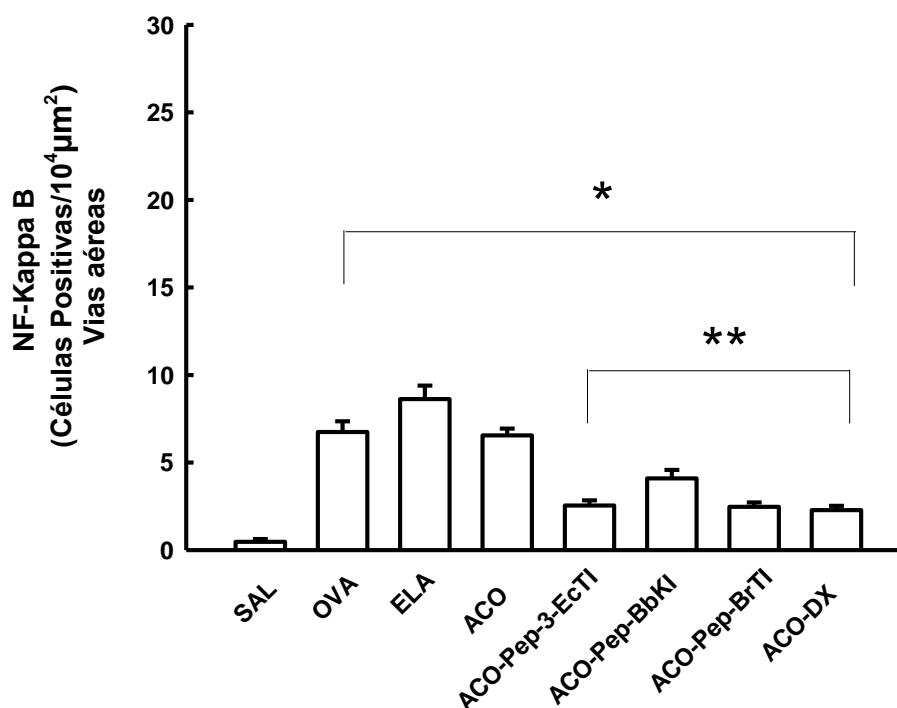


Figura 53. Número de células positivas para NF-KappaB (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.10.2 Avaliação do Número de Células Positivas para NF-KappaB nos Septos Alveolares

A *Figura 54* mostra a avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI, ACO-DX. Observamos aumento destas células nos grupos experimentais OVA ($6,2 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ELA ($9,0 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO ($5,9 \pm 0,4$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) quando comparados ao grupo SAL ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os grupos ACO-Pep-3-EcTI ($2,0 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BbKI ($3,3 \pm 0,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$), ACO-Pep-BrTI ($2,7 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) e ACO-DX ($2,0 \pm 0,3$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) atenuaram as alterações, sendo diferente de ACO e de SAL ($p > 0,05$ para todas as comparações).

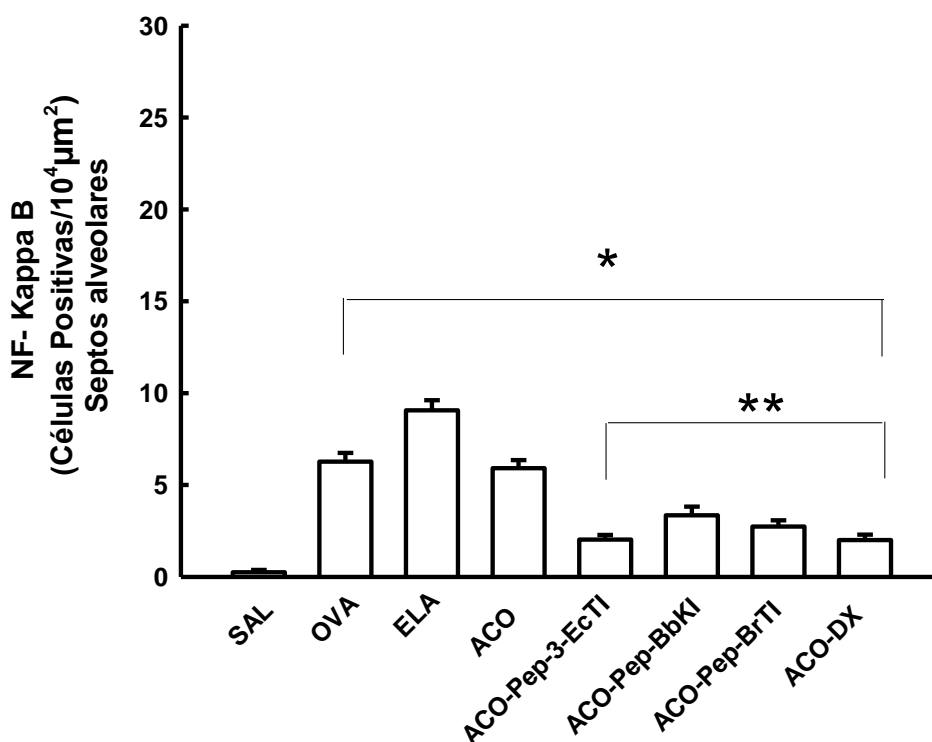


Figura 54. Número de células positivas para NF-KappaB (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO e nos grupos tratamento ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX; * $p < 0,05$ comparados ao grupo SAL; ** $p < 0,05$ comparados ao grupo ACO.

4.11 Análise Qualitativa

As figuras 55 e 56 expõem as fotomicrografias das vias aéreas e septos alveolares dos grupos experimentais representativas dos marcadores inflamatórios, marcadores de remodelamento tecidual, estresse oxidativo e fator de transcrição, representadas por células positivas para IL-5, IL-17, MMP-12, iNOS e NF-KappaB, nas vias aéreas (figura 55) e nos septos alveolares (figura 56).

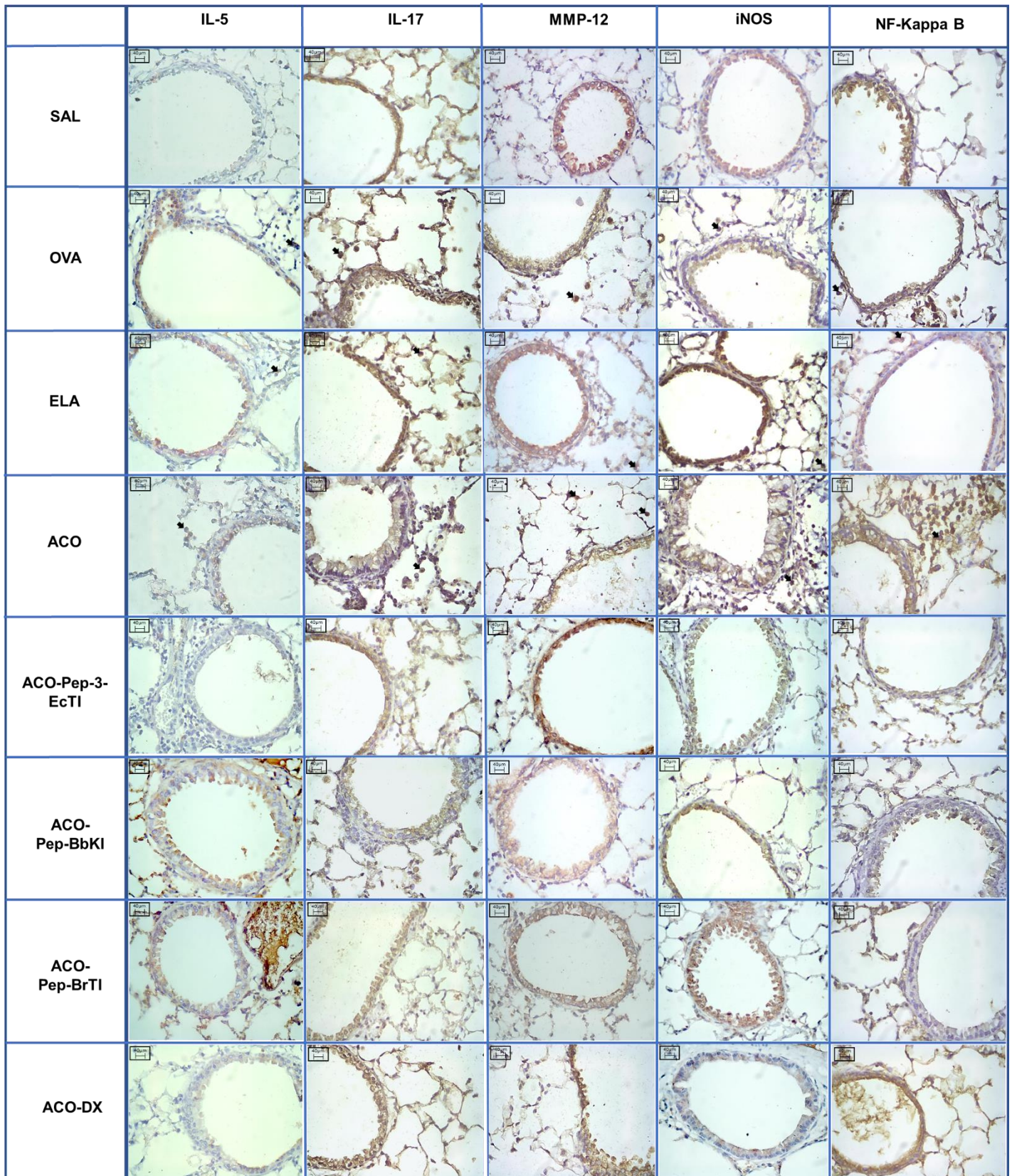


Figure 55. Fotomicrografias: Análise qualitativa das vias aéreas para marcadores inflamatórios, marcadores de remodelamento, estresse oxidativo e fator de transcrição. Fotos microscópicas dos resultados das análises imunohistoquímicas mostrando a presença de inflamação ao redor das vias aéreas. Aumento de 400x. Os grupos experimentais são SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3- EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX.

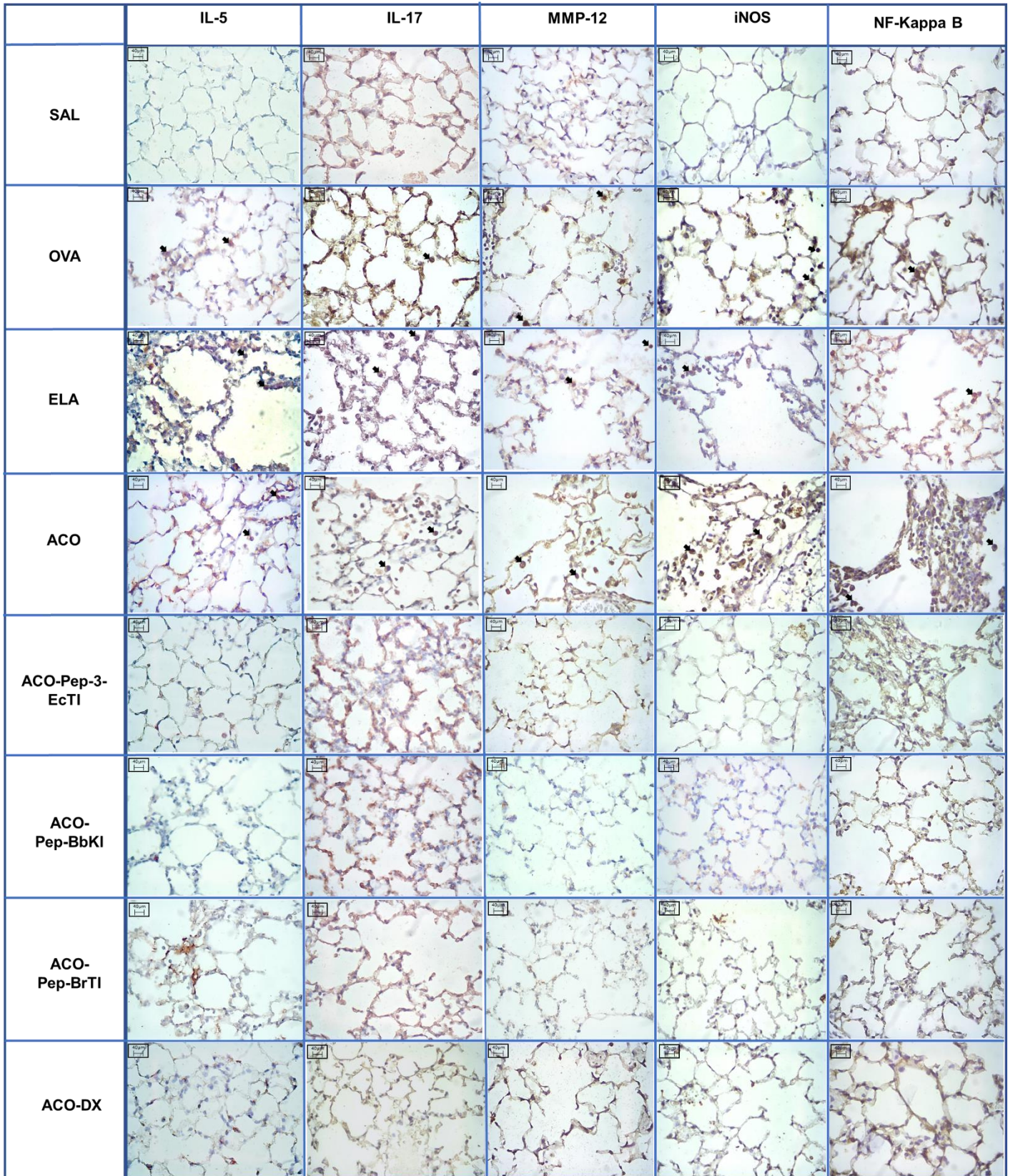


Figure 56. Fotomicrografias: Análise qualitativa dos septos alveolares para marcadores inflamatórios, marcadores de remodelamento, estresse oxidativo e fator de transcrição. Fotos microscópicas dos resultados das análises imunohistoquímicas mostrando a presença de inflamação no parênquima pulmonar. Aumento de 400x. Os grupos experimentais são SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-Pep-3- EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos peptídeos derivados das proteínas EcTI, BbKI e BrTI isolados e do tratamento associado com a dexametasona em modelo experimental de Sobreposição Asma-DPOC. Os animais sensibilizados, com inibidores de proteases de plantas ou com a dexametasona apresentaram atenuação da hiperresponsividade pulmonar, nos parâmetros avaliados que estão relacionados à resposta inflamatória, controle da lesão dos septos alveolares, estresse oxidativo, redução do remodelamento da matriz extracelular e de NF-KappaB, tanto nos septos alveolares, quanto nas vias aéreas. Na maioria das análises apresentadas não observamos diferença entre os tratamentos utilizados.

Estudos com camundongos são mais comumente explorados com modelos de asma ou enfisema do que com a sobreposição desses dois modelos experimentais. Sendo assim, no presente estudo, a Sobreposição Asma-DPOC foi adaptada do estudo de Ikeda e colaboradores (2014), que utilizaram a sensibilização com ovoalbumina (OVA), tanto via intraperitoneal quanto inalatória para o modelo de ASMA e a instilação de elastase pancreática porcina, via intratraqueal, para o enfisema. Ikeda e colaboradores (2014), observaram aumento de hiperresponsividade das vias aéreas à metacolina e da complacência do sistema respiratório. Também notou-se aumento nas células do lavado broncoalveolar no grupo ACO em relação ao grupo SAL, sendo que alguns desses dados corroboram nosso estudo. Diferente de Ikeda, no intuito de complementar o modelo de ACO utilizado, também avaliamos Raw, Htis e Gtis na curva dose resposta à metacolina, que correspondem às propriedades viscoelásticas dos sistema respiratório e resistência do tecido pulmonar. Em nossos resultados observamos que o modelo de ACO exacerbou a resposta inflamatória, aumento do espaçamento alveolar do tecido pulmonar e remodelamento pulmonar, sendo, para possíveis estratégias terapêuticas, um interessante modelo de pesquisa para sobreposição ASMA-DPOC.

Também foi possível constatar aumento do grupo ACO em comparação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$ para ambas as comparações) na análise % Gtis, mostrando assim aumento da resposta inflamatória comparada ao modelo asma, e

diminuição da %Ers e %Htis em comparação ao grupo OVA ($p < 0,05$), sendo uma resposta aceitável, já que o grupo ACO apresenta também características relacionadas ao modelo de enfisema (DPOC). O grupo ACO apresentou aumento da %Raw em relação ao grupo ELA, justificando assim suas características intermediárias tanto ao modelo de asma quanto ao de enfisema.

Nosso estudo contempla, além dos parâmetros avaliados no estudo de Ikeda et al. (2014), a resposta de remodelamento e estresse oxidativo, enaltecendo esse modelo de sobreposição asma-DPOC. Na avaliação do óxido nítrico exalado (NOex), o grupo ACO apresentou aumento em relação aos grupos OVA e ELA ($p < 0,05$), provavelmente em decorrência do aumento do estresse oxidativo.

Nossos grupos experimentais, conforme o protocolo, foram sensibilizados e tratados, tanto com dexametasona (ACO-DX), quanto com os inibidores de protease de plantas (ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI). Todos os tratamentos diminuíram tanto a resistência do sistema respiratório (%Rrs), quanto a resistência das vias aéreas (%Raw) e a resistência do tecido pulmonar (%Gtis). Essa atenuação da hiperresponsividade à metacolina, mostra a ação broncodilatadora dos peptídeos e da dexametasona.

Nossos resultados corroboram com o estudo de Rodrigues e colaboradores (2019), onde o tratamento com EcTI em camundongos sensibilizados com ovoalbumina diminuiu a Rrs em 21,5%.

Quando observamos a elastância do sistema respiratório (%Ers), o grupo ACO apresentou diminuição comparado ao grupo OVA e não apresentou diferença quando comparado ao grupo ELA, corroborando os dados encontrados em %Htis, o que mostra comprometimento da retração elástica devido à destruição da parede alveolar, decorrente do alargamento alveolar. Modelos de estudos anteriores, que realizaram também a administração da elastase intratraqueal, como em nosso estudo, mostraram aumento na Ers e Htis. Esses parâmetros foram reduzidos após o tratamento com os inibidores de serino-proteases como BbKI, CrataBL, BbCI and EcTI (Almeida-Reis et al., 2017, Martins-Oliveira et al., 2016, Oliva et al., 2015, Theodoro-Júnior et al., 2017). Todavia, na análise de nossos resultados constatamos a redução de Ers e Htis nos grupos ELA e ACO. Acreditamos que isso ocorra devido à diferença do momento em

que a elastase foi instilada e o momento de coleta da mecânica pulmonar: em nosso trabalho, esse intervalo de tempo foi de 7 dias e nos estudos acima citados foi de 28 dias. Nossa hipótese é que a lesão nos septos alveolares pode não ter tido tempo suficiente para se remodelar, já que o tempo foi mais curto e com maior lesão tecidual, menos tempo para recrutamento de fibras colágenas e assim uma diminuição na Ers e Htis para os grupos com modelo de enfisema e de sobreposição (ACO). Oliveira e colaboradores (2016) trazem a importância das fibras colágenas e elásticas no aumento da elastância e resistência do tecido pulmonar, onde esse aumento se dá proporcionalmente ao aumento da fração de volume da fibra colágena e elástica no grupo ELA. Sendo elas os principais constituintes da matriz extracelular, colaborando para propriedades mecânicas viscoelásticas do tecido pulmonar. Em nosso estudo, na análise da %Ers comparada ao grupo ACO, os grupos tratamento (ACO-DX, ACO-Pep-3-EcTI e ACO-Pep-BbKI) reverteram totalmente as alterações do grupo ACO e tornaram-se similares ao grupo controle SAL, sugerindo atenuação da destruição do parênquima pulmonar e melhora no recolhimento elástico. O tratamento ACO-Pep-BrTI não foi diferente de ACO, não sendo, porém, diferente do grupo SAL.

Theodoro-Junior e colaboradores (2017), em modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela elastase, utilizando o inibidor EcTI, mostraram atenuação da %Ers, da %Htis e da %Raw na mecânica pulmonar, corroborando com nosso estudo, nos parâmetros de %Ers e de %Raw, em que utilizamos um fragmento da proteína.

O mesmo efeito foi observado em relação aos estudos de Oliveira e colaboradores (2016), os pesquisadores relatam que o tratamento do grupo sensibilizado com elastase intratraqueal para criar um modelo de DPOC, apresentou efeito broncodilatador nas vias aéreas, demonstrado pela redução da resistência do sistema respiratório (Rrs) e da resistência das vias aéreas (Raw) nos grupos tratados com o inibidor BbKI. Nesse estudo, utilizamos os fragmentos do sítio reativo do inibidor e eles também foram eficazes em diminuir a %Raw e %Rrs.

O dano alveolar, característico do enfisema, pode ser observado pelo valor aumentado de Lm, já que ele compreende a medida do espaço médio entre as paredes alveolares opostas (GOLD, 2022). Em nosso estudo, podemos observar que o grupo ACO apresenta valores maiores que OVA e ELA, mostrando assim

hiperdistensão e destruição de septos alveolares associado a um processo de remodelamento dos componentes da matriz extracelular (Biselli et al., 2019). Estudos com inibidores de protease como o de Lourenço e colaboradores (2014), trazem diminuição da medida do Lm após o tratamento, o que corrobora nosso estudo, onde os peptídeos e a dexametasona reverteram totalmente as alterações quando comparados ao grupo ACO, sugerindo atenuação da lesão pulmonar.

Para a avaliação da inflamação pulmonar analisamos o lavado broncoalveolar, sendo esta uma das maneiras mais efetivas para essa estimativa (Churg e Wright, 2005). Assim, nesse estudo, os grupos tratamento obtiveram diminuição significativa no número de células do lavado broncoalveolar (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos). Na análise dos linfócitos, apenas os grupos (ACO-Pep-3-EcTI e ACO-DX) apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo ACO, indicando um efeito anti-inflamatório importante nos inibidores de protease de plantas e na dexametasona. Quando comparados os tratamentos com peptídeos e dexametasona entre si eles não apresentaram diferença significativa.

No nosso estudo os grupos tratamento ACO-Pep-3-BbKI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX apresentaram redução na concentração de eosinófilos, porém os tratamentos com peptídeos (Pep-BbKI e Pep-BrTI) não atenuaram a resposta linfocitária. Semelhante a essa resposta, o estudo de Florencio e colaboradores (2019) e Lourenço e colaboradores (2014), respectivamente, avaliaram o efeito do rBmTI-A (inibidor de serinoprotease) em modelo asma e enfisema pulmonar e observaram redução na concentração de eosinófilos, não havendo redução linfocitária.

Para uma melhor caracterização da resposta inflamatória e das citocinas nela envolvidas, em nosso estudo foi realizada a análise imunohistoquímica.

As citocinas têm um papel importante na regulação e ativação da asma e como a ACO também apresenta algumas características da asma, podemos comprovar nesse estudo que os grupos tratamentos ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX apresentaram boa resposta no controle inflamatório. O grupo ACO na análise de IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10 (via aérea), IL-13 (septos alveolares), INF- γ (via aérea) e TNF- α (septos alveolares) apresentou valores aumentados quando comparado à ELA e à OVA. Já o grupo ACO em IL-17 apresentou maiores níveis

somente quando comparado ao grupo OVA. Essas análises corroboram o estudo de Ikeda et al. (2014), onde o grupo que foi realizada a associação com OVA e ELA, apresentou aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, dos níveis de leucotrienos e de células T CD4+ e CD8+ no BALF, comparativamente aos animais que foram sensibilizados com OVA ou ELA, confirmando que o grupo ACO apresenta maior inflamação pulmonar.

Em nosso estudo, na análise da IL-1 β , nas vias aéreas, os grupos tratamento tanto com dexametasona, quanto com os peptídeos atenuaram a resposta de ACO. Diferente da análise de septos alveolares, os tratamentos com dexametasona e tratamento com peptídeos EcTI e BbKI (Pep-3-EcTI e Pep-BbKI) apresentaram reversão total, porém o peptídeo BrTI não mostrou redução significativa dos valores. Os peptídeos derivados EcTI e BbKI foram tão eficazes quanto a dexametasona nessa análise.

IL-1 β recentemente tem sido discutido em casos de asma grave e relacionado a exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), mas os mecanismos ainda precisam de mais estudos. Mahmutovic *et al.* (2018) em modelo experimental de asma induzida por rinovírus, sugerem que as vias de sinalização de IL-1 β podem estar envolvidas na indução de características neutrofílicas e de células Th2 de exacerbações de asma induzidas por vírus.

A citocina IL-5 é importante no recrutamento de eosinófilos para a via aérea, já a IL-13 cursa com a indução da hiperresponsividade brônquica, hiperplasia de células goblets e produção de mucina (Hamid e Tulic, 2009). Essas citocinas, quando liberadas, podem comprometer a integridade epitelial, pois induzem a contração da musculatura lisa das vias aéreas, secreção de muco, vasodilatação e exsudação de plasma (Hawrylowicz, 2005; Galil e Tsai, 2008). Estudos demonstram que a inibição da IL-5 é eficaz na redução das exacerbações principalmente de asma grave, sobretudo no subgrupo de patogenia eosinofílica (Schuijjs et al., 2013). Quanto à IL-4 liberada pelos mastócitos, tem por objetivo perpetuar a produção de IgE e consequentemente os eventos inflamatórios nas vias aéreas (Hendeles et al., 2004; Lemanske e Busse, 2010). Citocinas como IL-4 e IL-13 induzem a remodelação e a hiperresponsividade.

No presente estudo os grupos tratamento, tanto com os peptídeos quanto com a dexametasona, atenuaram a concentração de IL-5 quando comparados com o grupo ACO. Na análise de vias aéreas, os peptídeos BbKI e BrTI reverteram totalmente a inflamação. Na análise dos septos alveolares todos os peptídeos reverteram o quadro, não sendo diferentes do grupo SAL. Isso traduz uma redução da inflamação eosinofílica, prevenindo assim possíveis exacerbações. Vale ressaltar que os grupos dos peptídeos foram diferentes do grupo ACO-DX, apenas na análise de vias aéreas, sendo, no entanto, menores do que ele, mostrando sua efetividade.

Quando analisamos a IL-4 nas vias aéreas observamos que os grupos tratamento não foram atenuados em relação ao grupo ACO, porém em septos alveolares observamos atenuação da resposta inflamatória comparada a ACO, apenas nos grupos ACO-Pep-3-EcTI e ACO-DX.

Estudo de Rodrigues e colaboradores (2019) corroboram com nosso estudo, onde mostra-se a atenuação dos valores de IL-5, IL-6 e IL-13. Assim como, os estudos de Florencio e colaboradores (2018), que utilizaram o inibidor de protease rBmTI-A, que apresentou atenuação dos valores de IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17.

Muitos estudos vêm analisando as células T-helper (Th)-17 (IL-17) em diversas doenças auto-imunes e inflamatórias. O aumento da expressão de IL-17 está presente no pulmão, na expectoração, no fluido do lavado broncoalveolar e nos soros de pacientes com asma, sendo a gravidade da asma positivamente correlacionada com os níveis de expressão de IL-17 (Molet et al., 2001; Wang e Wills-Karp, 2011). Estudos mostram que a IL-17 promove eosinofilia nas vias aéreas, estando envolvida na fibrose e remodelamento das vias aéreas (Chakir et al., 2003; Alcorn et al., 2010; Al-Muhsen et al., 2011). Além disso, alguns estudos mostram que essa citocina pode induzir a IL-1 β , IL-6 e TNF- α e pode também aumentar a expressão de iNOS, estando envolvida no recrutamento de macrófagos e neutrófilos (Ponce-Gallegos et al., 2017).

Em nossa análise, as citocinas IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17, nos grupos tratamento com peptídeos, apresentaram resultados tão bons quanto com o tratamento com os corticosteroides, reduzindo os valores em comparação ao grupo ACO, não sendo, ainda, diferentes do grupo SAL. Isso atesta a eficácia desses tratamentos, fazendo alusão a resultados promissores no uso desses peptídeos como possíveis fármacos.

Prado e colaboradores (2011) trouxeram informações de que o óxido nítrico tem um papel importante na fisiopatologia da asma. O óxido nítrico (NO) e o isoprostano são considerados biomarcadores de estresse oxidativo. Os altos níveis desses marcadores aumentam os efeitos nocivos nos pulmões (Righetti et al., 2014).

Mostramos que, em relação ao estresse oxidativo, houve redução no óxido nítrico exalado e iNOS (vias aéreas e septos alveolares) nos grupos tratamento, ACO-Pep-3-EcTI, ACO-Pep-BbKI, ACO-Pep-BrTI e ACO-DX, quando comparados ao grupo ACO, sem diferença entre os grupos tratamento. Em relação à resposta de remodelamento pulmonar, na análise de MMP-9, MMP-12 e TGF- β , tanto nas vias aéreas quanto nos septos alveolares, observamos atenuação dos grupos tratados em relação ao grupo ACO.

Corroborando nosso estudo, Theodoro-Junior e colaboradores (2017), mostraram, em seu modelo experimental de enfisema, que o inibidor EcTI atenuou a resposta do estresse oxidativo com redução de expressão celular de NOex e iNOS, tanto nos septos alveolares, como em vias aéreas. Rodrigues e colaboradores (2019), mostraram que o tratamento com EcTI, em animais sensibilizados com ovoalbumina, reduziu em 66% o número de células positivas para iNOS nas vias aéreas e em 56% nos septos alveolares, provavelmente devido à redução da inflamação eosinofílica e da expressão de citocinas inflamatórias nas vias aéreas e nos septos alveolares. No estudo de Oliveira e colaboradores (2016), o grupo tratado com BbKI apresentou resposta atenuada, com redução da expressão de células positivas para iNOS e NOex, nos septos alveolares e das vias aéreas.

Diferente de nosso resultado, o estudo de Almeida-Reis (2017) na análise de NOex após o tratamento com BbCI não mostrou atenuação dos valores, porém a iNOS após o tratamento com o inibidor mostrou-se efetiva na diminuição desses resultados.

Rodrigues e colaboradores (2019), corroborando com nosso estudo, mostrou que o tratamento com o EcTI em animais sensibilizados com ovoalbumina reduziu o número de células positivas para iNOS nas vias aéreas e paredes alveolares em mais de 56%, provavelmente devido à redução dos marcadores inflamatórios.

Estudos sugerem que as classes de serina, cisteína e metaloproteases são as classes mais prováveis de estarem envolvidas na patogênese da DPOC. Protease 3,

elastase de neutrófilos e catepsina G são proteases da classe serina, armazenadas por células polimorfonucleares (PMN) e monócitos, e liberadas quando mediadores pró-inflamatórios induzem a degranulação de PMN. Essas proteases estão frequentemente relacionadas à destruição do parênquima pulmonar e à produção de muco. A classe das cisteínas é representada pelas catepsinas S e L, que são elastases potentes e auxiliam na degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. A classe das metaloproteases é representada por MMP-1, 2, 9 e 14 e desintegrina (ADAM). Além de promover a degradação do colágeno e da elastina, as metaloproteases também aumentam a expressão de MUC-5AC (Theodoro-Junior et al., 2017).

A MMP-12 tem sido estudada e descrita como uma metaloprotease liberada principalmente por macrófagos, sugerida como uma importante enzima elastolítica responsável por lesões enfisematosas, em roedores. Nosso estudo corrobora o estudo de Florencio e colaboradores (2019), pois demonstramos que o tratamento com peptídeos (EcTI, BbKI e BrTI) e dexametasona foram suficientes para reduzir o número de células positivas para MMP-12, o que poderia explicar o efeito inibitório da dexametasona e dos peptídeos na destruição do parênquima pulmonar.

O NF-KappaB está intimamente ligado ao estresse oxidativo, pois a ativação exagerada do NF-KappaB perpetua a produção de mediadores inflamatórios na asma grave e pode piorar a DPOC, pois o NF-KappaB está ligado ao TNF- α , IL-8 e outras células inflamatórias. Deve-se notar também que a expressão de iNOS e as citocinas do perfil Th2 e Th17 são dependentes da transcrição de NF-KappaB (Fukuzaki, 2019). Portanto, podemos analisar em nosso estudo que os grupos experimentais de ACO, ELA e OVA apresentaram valores aumentados para NF-KappaB e os tratamentos conseguiram reduzir esses valores do grupo ACO. Há estudos que utilizam inibidores de proteases vegetais em modelos experimentais de asma e enfisema, onde não houve análise para os valores de NF-KappaB (Almeida-Reis, 2013; Rodrigues et al., 2019; Oliveira et al., 2016; Theodoro-Junior et al., 2017).

Esta pesquisa real teve suas limitações: não foi realizada uma análise do perfil de toxicidade dos inibidores utilizados. Mesmo assim, outros modelos experimentais utilizando inibidores, tais como EcTI, BbKI, BbCI, e rBmTI-A, não apresentaram efeitos adversos (Oliveira et al., 2016; Theodoro-Junior et al., 2017; Almeida-Reis, 2013;

Florencio et al., 2019). Nossos resultados suportam a importância dos tratamentos com Pep-3-EcTI, Pep-BbKI e Pep-BrTI na mecânica, resposta inflamatória pulmonar, remodelação da matriz extracelular e estresse oxidativo nos pulmões. Temos que levar em conta que mesmo sendo compostos naturais de origem vegetal com atividade inibidora de proteases, ainda não são seguros para extrapolar esses achados para seres humanos. Mais estudos são necessários para avaliar essas questões e elucidar os mecanismos de ação responsáveis pelas alterações acima descritas e só então transpô-los para estudos clínicos.

Para reforçar nossos resultados gostaríamos de ter analisado TIMP-1 e 8-iso-PGF2 α , o que não foi possível devido à pandemia, que gerou dificuldades nos prazos de importação de material para o mundo todo. No entanto, nossos achados suportam vários parâmetros que podem ser úteis para futuras pesquisas para o tratamento da ACO.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

No modelo experimental de sobreposição asma-DPOC realizado nesse estudo, podemos concluir que os peptídeos (Pep-3-EcTI, Pep-BbKI e Pep-BrTI) apresentaram resultados semelhantes com a dexametasona, sendo o Pep-3-EcTI apresentou melhores resultados em comparação à dexametasona, que tem sido um tratamento padrão-ouro atual para pacientes com ACO. Assim, conseguimos identificar fragmentos das proteínas inibidoras que agiram de forma bastante eficaz atenuando a hiperresponsividade brônquica, a resposta inflamatória, a remodelação da matriz extracelular e o estresse oxidativo nos pulmões deste modelo experimental de lesão pulmonar induzida tanto pela ovoalbumina quanto pela elastase intratraqueal.

Esses achados são muito promissores e podem ser uma estratégia terapêutica para o tratamento da ACO, além disso, devemos considerar que, por serem de mais fácil produção, a utilização dos peptídeos é uma probabilidade de aplicação tecnológica importante para o uso de produtos naturais para os desenvolvimentos de novos medicamentos, embora sejam necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCORN, J. F.; CROWE, C. R.; KOLLS, J. K. TH17 cells in asthma and COPD. **Annual review of physiology**, v. 72, n. 1, p. 495–516, 2010.

ALMEIDA-REIS, R. et al. Plant proteinase inhibitor BbCI modulates lung inflammatory responses and mechanic and remodeling alterations induced by elastase in mice. **BioMed research international**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

AL-MUHSEN, S.; JOHNSON, J. R.; HAMID, Q. Remodeling in asthma. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 128, n. 3, p. 451–62; quiz 463–4, 2011.

ANGELI, P. et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 294, n. 6, p. L1197-205, 2008.

ARAÚJO, A. P. U. et al. Kunitz-type Bauhinia bauhinioides inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. **Biological chemistry**, v. 386, n. 6, 2005.

BAGNASCO, D. et al. The path to personalized medicine in asthma. **Expert review of respiratory medicine**, v. 10, n. 9, p. 957–965, 2016.

BARNES, P. J. NO or no NO in asthma? **Thorax**, v. 51, n. 2, p. 218–220, 1996.

BARNES, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 4, p. 515–548, 2004.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 2008.

BARNES, P. J. **Chronic obstructive pulmonary disease. Nat Rev Dis Primers 1.** [s.l: s.n.].

BARNES, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 131, n. 13, p. 1541–1558, 2017.

BARNIG, C.; MARTIN, C. Asthme et microbiome. **Revue des maladies respiratoires**, v. 35, n. 2, p. 103–115, 2018.

BISELLI, P. J. C. et al. Analysis of respiratory mechanics in animal models: Its use in understanding lung behavior in emphysema and asthma. **Drug discovery today. Disease models**, v. 29–30, p. 11–17, 2019.

BLACK, J. L. Asthma-More Muscle Cells or More Muscular Cells? **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, n. 9, p. 980–981, 2004.

BONTURI, C. R. et al. Could a plant derived protein potentiate the anticancer effects of a stem cell in brain cancer? **Oncotarget**, v. 9, n. 30, p. 21296–21312, 2018.

BONTURI, C. R. et al. Plant Kunitz inhibitors and their interaction with proteases: Current and potential pharmacological targets. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, p. 4742, 2022.

BORTOLOZZO, A. S. S. et al. The plant proteinase inhibitor CrataBL plays a role in controlling asthma response in mice. **BioMed research international**, v. 2018, p. 9274817, 2018.

BOURDIN, A. et al. Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities. **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, v. 18, n. 114, p. 198–212, 2009.

BOUSQUET, J. et al. Asthma: From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 161, n. 5, p. 1720–1745, 2000.

Brasil, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Morbidade Hospitalar do SUS, 2020. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: 8. jan.2023

BREDET, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768–770, 1990.

CAMARGO, L. DO N. et al. Effects of anti-IL-17 on inflammation, remodeling, and oxidative stress in an experimental model of asthma exacerbated by LPS. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1835, 2018.

CHAKIR, J. et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 6, p. 1293–1298, 2003.

CHURG, A.; WRIGHT, J. L. Proteases and emphysema. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 11, n. 2, p. 153–159, 2005.

COHN, L.; ELIAS, J. A.; CHUPP, G. L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annual review of immunology**, v. 22, n. 1, p. 789–815, 2004.

CRUSE, G.; BRADDING, P. Mast cells in airway diseases and interstitial lung disease. **European journal of pharmacology**, v. 778, p. 125–138, 2016.

DE GROOT, L. E. S. et al. Oxidative stress and macrophages: driving forces behind exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease? **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 316, n. 2, p. L369–L384, 2019.

DE PAULA, C. A. A. et al. Enterolobium contortisiliquum trypsin inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-focal adhesion kinase (FAK) signaling pathways. **The journal of biological chemistry**, v. 287, n. 1, p. 170–182, 2012.

DESHMUKH, H. S. et al. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 4, p. 305–314, 2005.

EAPEN, M. S. et al. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a true paradox. **Expert review of respiratory medicine**, v. 11, n. 10, p. 827–839, 2017.

FISCHER, B.; PAVLISKO, E.; VOYNOW, J. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, p. 413, 2011.

FLORENCIO, A. C. et al. Effects of the serine protease inhibitor rBmTI-A in an experimental mouse model of chronic allergic pulmonary inflammation. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, 2019.

FUKUZAKI, Silvia. **Efeito preventivo e terapêutico do anti IL-17 em modelo experimental de lesão pulmonar induzida pela elastase em camundongos C57B16**. 2019. Dissertação (Mestrado em Processos Inflamatórios e Alérgicos) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. doi:10.11606/D.5.2019.tde-04072019-145319. Acesso em: 2023-02-06.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 2008.

GAO, Z.-G.; JACOBSON, K. A. Purinergic signaling in mast cell degranulation and asthma. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, 2017.

GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet Resp. Med**, v. 8, p. 585–596, 1990.

Global strategy for asthma management and prevention. Disponível em: <<https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2022/05/GINA-Main-Report-2022-FINAL-22-05-03-WMS.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD (2022 Report). Disponível em: <<https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2>>. Acesso em: 8 jan.2023.

GOSSET, T.-L. I.; TONNEL, P. Inflammatory events in severe acute asthma. **Allergy**, v. 60, n. 1, p. 23–29, 2005.

Guide for Grants and Contracts. United States (US), Special Edition: Laboratory Animal Welfare. **National Institutes of Health**, v. 14, n. 8, 1985.

HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annual review of physiology**, v. 71, n. 1, p. 489–507, 2009.

HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. **The journal of experimental medicine**, v. 202, n. 11, p. 1459–1463, 2005.

HENDELES, L.; ASMUS, M.; CHESROWN, S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. **Paediatric respiratory reviews**, v. 5, p. S107–S112, 2004.

HIRST, S. J. et al. Proliferative aspects of airway smooth muscle. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 114, n. 2 Suppl, p. S2-17, 2004.

HOLGATE, S. T. et al. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 162, n. supplement_2, p. S113–S117, 2000.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature medicine**, v. 18, n. 5, p. 673–683, 2012.

HOSTETTER, M. K. RGD-mediated adhesion in fungal pathogens of humans, plants and insects. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 344–348, 2000.

HSIA, C. C. W. et al. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung

structure. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 181, n. 4, p. 394–418, 2010.

IKEDA, G. et al. Effect of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on experimental emphysema and asthma combined with emphysema. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 50, n. 1, p. 18–29, 2014.

ITO, J. T. et al. Extracellular matrix component remodeling in respiratory diseases: What has been found in clinical and experimental studies? **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 4, p. 342, 2019.

JAMES, A. L.; WENZEL, S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. **The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 30, n. 1, p. 134–155, 2007.

JOHNSON, S. R.; KNOX, A. J. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. **Trends in pharmacological sciences**, v. 18, n. 8, p. 288–292, 1997.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: A multi-functional master cell. **Frontiers in immunology**, v. 6, 2016.

LAMAS, S. et al. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 14, p. 6348–6352, 1992.

LAPPERRE, T. S. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. **Thorax**, v. 61, n. 2, p. 115–121, 2006.

LEICK-MALDONADO, E. A. et al. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 34, n. 1, p. 145–152, 2004.

LEMANSKE, R. F., Jr; BUSSE, W. W. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 125, n. 2, p. S95–S102, 2010.

LI, N. et al. Particulate air pollutants and asthma. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 109, n. 3, p. 250–265, 2003.

LOURENÇO, J. D. et al. A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98216, 2014.

MAHMUTOVIC PERSSON, I. et al. IL-1 β mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation. **Respiratory research**, v. 19, n. 1, 2018.

MARGRAF, I. R. et al. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. **The American review of respiratory disease**, v. 143, n. 2, p. 391–400, 1991.

MARTINS-OLIVERA, B. T. et al. The plant-derived *Bauhinia bauhinioides* kallikrein proteinase Inhibitor (rBbKI) attenuates elastase-induced emphysema in mice. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

MEDINA, A. F. et al. The impairment of plasma kallikrein action on homeostasis by kallikrein inhibitor comprising RGD sequence established a novel target in antithrombotic therapies. **Process biochemistry (Barking, London, England)**, v. 122, p. 1–12, 2022.

MEKOV, E. et al. Update on asthma-COPD overlap (ACO): A narrative review. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 16, p. 1783–1799, 2021.

Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/asma>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

MITCHELL, R. N. **Fundamentos de Patologia - Robbins & Cotran**. Rio de Janeiro: Elsevier/Medicina Nacionais, 2012.

MOLET, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. **The journal of allergy and clinical immunology**, v. 108, n. 3, p. 430–438, 2001.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European journal of clinical investigation**, v. 21, n. 4, p. 361–374, 1991.

NADEEM, A. et al. Airway and systemic oxidant-antioxidant dysregulation in asthma: a possible scenario of oxidants spill over from lung into blood. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 29, n. 1, p. 31–40, 2014.

NAKAHATA, A. The effects of a plant protease inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. **Biological chemistry**, n. 4, p. 327–336, 2011.

NAKAHATA, A. M. et al. Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. **International journal of biological macromolecules**, v. 40, n. 1, p. 22–29, 2006.

OLIVA, L. V. et al. A plant proteinase inhibitor from *Crataeva tapia* (CrataBL) attenuates elastase-induced pulmonary inflammatory, remodeling, and mechanical alterations in mice. **Process biochemistry (Barking, London, England)**, v. 50, n. 11, p. 1958–1965, 2015.

OLIVA, M. L. V. et al. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1–3, p. 163–169, 1999.

OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 615–621, 2009.

OWEN, C. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 3, p. 253–268, 2008.

PONCE-GALLEGOS, M.; RAMÍREZ-VENEGAS, A.; FALFÁN-VALENCIA, R. Th17 profile in COPD exacerbations. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 12, p. 1857–1865, 2017.

POSSA, S. S. et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 303, n. 11, p. L939–L952, 2012.

PRADO, C. M. et al. Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in bronchial vascular remodeling-induced by chronic allergic pulmonary inflammation. **Experimental lung research**, v. 37, n. 5, p. 259–268, 2011.

RIGHETTI, R. F. et al. Effects of Rho-kinase inhibition in lung tissue with chronic inflammation. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 192, p. 134–146, 2014.

ROBBINS & COTRAN - PATOLOGIA; ABBAS, A. K.; KUMAR, V. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. Medicina Nacionais, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROBERTONI, F. S. Z. et al. Collagenase mRNA Overexpression and decreased extracellular matrix components are early events in the pathogenesis of emphysema. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129590, 2015.

RODRIGUES, A. P. D. et al. A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in a mouse model of asthma. **Histology and histopathology**, v. 34, n. 5, p. 537–552, 2019.

ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 85, n. 1, p. 9–21, 2000.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. **Cell**, v. 44, n. 4, p. 517–518, 1986.

SAITO, S. et al. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). **Journal of thoracic disease**, v. 11, n. S14, p. S1740–S1754, 2019.

SANTOS, T. M. Effect of anti-IL17 antibody treatment alone and in combination with Rho-kinase inhibitor in a murine model of asthma. **Frontiers in physiology**, n. 9, 2018.

SCHUIJS, M. J. et al. Cytokine targets in airway inflammation. **Current opinion in pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 351–361, 2013.

SHIGETOMI, H. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. **Inflammation research**, p. 679–687, 2010.

SHIRAKI, A. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-isoPGF₂α-induced contraction in airway smooth muscle. **Clinical & Experimental Allergy**, p. 236–245, 2009.

SOUZA, F. C. R. DE. **Efeitos dos inibidores de NF Kappa-B e Rho Quinase em um modelo de asma animal: comparação com o tratamento com corticosteroides**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 15 dez. 2018.

STARLING, C. M. et al. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic pulmonary inflammation in guinea pigs. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 165, n. 2–3, p. 185–194, 2009.

TAGUCHI, L. et al. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- κ B, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory research**, v. 16, n. 1, 2015.

THEODORO-JÚNIOR, O. et al. A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates pulmonary mechanics, inflammation and remodeling induced by elastase in mice. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, p. 403, 2017.

TOLEDO, A. C. et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model: Sakuranetin ameliorates chronic airway inflammation. **British journal of pharmacology**, v. 168, n. 7, p. 1736–1749, 2013.

VALENTE, P. F. Um inibidor recombinante modificado de calicreínas contendo os motivos RGD e RGE) e dos peptídeos relacionados em células de câncer de mama triplo negativo. v. 87, [s.d.].

VOGELMEIER, C. F. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 195, n. 5, p. 557–582, 2017.

WANG, Y.-H.; WILLS-KARP, M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. **Current allergy and asthma reports**, v. 11, n. 5, p. 388–394, 2011.

WOODRUFF, P. G. et al. /National Heart, Lung, and Blood Institute Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Workshop Report. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 196, n. 3, p. 375–381, 2017.

YANAGISAWA, S.; ICHINOSE, M. Definition and diagnosis of asthma–COPD overlap (ACO). **Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 67, n. 2, p. 172–178, 2018.

ZHOU, D. Crystal structures of a plant trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of its complex with bovine trypsin. **PloS One**, 2013.