

**LUANA LAURA SALES DA SILVA**

**Efeitos do peptídeo derivado da sequência primária do inibidor de caliceína isolado de *Bauhinia bauhinoides* (pep-BbKI) na inflamação, remodelamento, estresse oxidativo em um modelo de sobreposição de asma-DPOC (ACO)**

**São Paulo  
2022**



**LUANA LAURA SALES DA SILVA**

**Efeitos do peptídeo derivado da sequência primária do inibidor de calicreína isolado de *Bauhinia bauhinioides* (pep-BbKI) na inflamação, remodelamento, estresse oxidativo em um modelo de sobreposição de asma-DPOC (ACO)**

Versão Original

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos

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

**São Paulo  
2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Luana Laura Sales da

Efeitos do peptídeo derivado da sequência primária do inibidor de calicreína isolado de *Bauhinia bauhinioides* (pep-BbKI) na inflamação, remodelamento, estresse oxidativo em um modelo de sobreposição de asma-DPOC (ACO) / Luana Laura Sales da Silva -- São Paulo, 2022.

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

Orientadora: Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério.

Descritores: 1.Síndrome de sobreposição da doença pulmonar obstrutiva crônica e asma 2.Inflamação 3.Inibidor de serino proteinase 4.Bauhinia 5.Estresse oxidativo 6.Remodelação de vias aéreas

USP/FM/DBD-333/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: SILVA, Luana Laura Sales

Título: Efeitos do peptídeo derivado da sequência primária do inibidor de calicreína isolado de *Bauhinia bauhinioides* (pep-BbKI) na inflamação, remodelamento, estresse oxidativo em um modelo de sobreposição de asma-DPOC (ACO)

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha família amada: André, Maria Eugênia, Jair, Rodrigo, Ana Carolina, Carlos Eduardo, Sandro, Priscila e Maria Eduarda.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Iolanda Tibério, pelos ensinamentos, orientação, paciência e pela oportunidade do mestrado na minha vida;

Ao Dr. Renato Righetti, primeiramente pela amizade e depois por ter sido um grande coorientador;

Às minhas companheiras de trabalho com peptídeos, e agora amigas, Jéssica Anastácia e Juliana Morelli por terem sido apoio o tempo todo nesse período, de superação, aprendizagem, foi uma jornada longa;

À Dra. Edna Leick, pelos ensinamentos, cobranças e revisões;

À Dra. Carla Prado, ao Dr. Francisco Soriano e Dra. Clarice Olivo, pelas correções no exame de qualificação;

À Profa. Dra. Maria Luiza Oliva e a Dra. Camila Bonturi, pela disponibilização do pep-BbKI e apoio técnico e teórico;

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo número do processo 2018/02537-5 e 2019/27807-8;

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

Ao aluno Arthur Silva Costa da iniciação científica, meu muito obrigada;

Meus amigos de plantão, equipe A8 do Hospital Nove de Julho, Rosana Pires pelas liberações, Josileia e Tatiana por me apoiarem na ausência do plantão, e também com incentivos e carinho.

Às amigas da faculdade que se tornaram família;

Aos meus pais amados Maria Eugênia e Jair, pelo amor infinito, por me apoiarem e rezarem sempre por mim;

Aos meus irmãos Rodrigo e Sandro, cunhadas Ana Carolina e Priscila, e agora amados sobrinhos que vieram para me dar grande felicidade, pela torcida;

Aos meus sogros Antônio e Adelina por torcerem e rezarem por mim;

Ao meu marido André, pelo apoio, amor, carinho e paciência durante todo o processo;

E principalmente a Deus, sem Ele nada disso aconteceria.

A todos meu muito obrigada!

## RESUMO

Silva LLS. Efeitos do peptídeo derivado da sequência primária do inibidor de caliceína isolado de *Bauhinia bauhinoides* (pep-BbKI) na inflamação, remodelamento, estresse oxidativo em um modelo de sobreposição de asma-DPOC (ACO) [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

**INTRODUÇÃO:** Há uma significativa proporção de pacientes com fenótipos de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (sobreposição asma-DPOC - ACO). Um peptídeo derivado da sequência primária do inibidor de caliceína isolado de *Bauhinia bauhinoides* (pep-BbKI) tem sido associado a efeitos anti-inflamatório e antioxidante, e poderia ser um potencial novo tratamento para ACO. **OBJETIVOS:** Investigar os efeitos do tratamento com pep-BbKI em um modelo de ACO e comparar ao tratamento com corticosteroide. **MÉTODOS:** Sessenta e quatro camundongos Balb/c (25-30g) foram divididos em oito grupos: SAL (salina), OVA (sensibilizados com ovalbumina intraperitoneal e nebulização), ELA (elastase intratraqueal), ACO (ovalbumina + elastase), ACO-pep-BbKI (protocolos OVA+ELA tratados com pep-BbKI), ACO-DX (OVA+ELA tratados com dexametasona), ACO-DX-pep-BbKI (OVA+ELA tratados com dexametasona e pep-BbKI) e SAL-pep-BbKI (grupo SAL tratado com pep-BbKI). Avaliamos: hiperresponsividade à metacolina, óxido nítrico exalado (NO<sub>ex</sub>), células inflamatórias do lavado broncoalveolar e marcadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), marcadores de remodelamento (MMP-9, MMP-12, TGF- $\beta$  e fibras colágenas), marcador de estresse oxidativo (iNOS), intercepto linear médio (Lm) e via de sinalização NF-kappaB, nas vias aéreas (VA) e septos alveolares (SA). Utilizamos *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) seguido pelo Holm-Sidak, e *test t* para as análises estatísticas e considerado significativo  $p < 0,05$ . **RESULTADOS:** Houve aumento da resistência do sistema respiratório (%Rrs), de via aérea (%Raw) e de tecido (%Gtis), Lm, células totais, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MMP-9, MMP-12, TGF- $\beta$ , fibras colágenas no grupo ACO comparado a OVA e/ou ELA ( $p < 0,05$ ). Após o tratamento, com pep-BbKI e/ou dexametasona, houve atenuação das respostas comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ). O grupo ACO-pep-BbKI reverteu totalmente as alterações comparado ao SAL em %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, %Htis, Lm, neutrófilos, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  MMP-12 (VA), fibras colágenas, iNOS



(VA) e NOex ( $p>0,05$ ). ACO-DX reverteu as alterações comparado a SAL em %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, %Htis, Lm, células totais e diferenciais, IL-1 $\beta$ (SA), IL-5 (SA), IL-6 (SA), IL-10 (SA), IL-13 (SA), IFN- $\gamma$ , MMP-12 (VA), TGF- $\beta$  (SA), fibras colágenas (VA), iNOS e NOex ( $p>0,05$ ). O grupo ACO-DX-pep-BbKI potencializou a redução das alterações comparado a ACO-pep-BbKI e ACO-DX para MMP-12 (SA)( $p<0,05$ ). O grupo SAL foi semelhante ao SAL-pep-BbKI ( $p>0,05$ ) para todas as comparações, portanto utilizamos SAL como grupo controle. **CONCLUSÕES:** Os tratamentos com pep-BbKI e dexametasona foram igualmente eficazes na redução da hiperresponsividade à metacolina, inflamação, remodelamento, e estresse oxidativo no modelo experimental de ACO.

Palavras-chave: Síndrome de sobreposição da doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. Inflamação. Inibidor de serino proteinase. Bauhinia. Estresse oxidativo. Remodelação de vias aéreas.

## ABSTRACT

Silva LLS. Effects of a peptide derived from the primary sequence of a kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* (pep-BbKI) on inflammation, remodeling, and oxidative stress in an asthma-COPD overlap (ACO) model [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo"; 2022.

**INTRODUCTION:** There is a significant proportion of patients with mixed asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) phenotypes (asthma-COPD overlap - ACO). A peptide derived from the primary sequence of a kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* (pep-BbKI) has been associated to potent anti-inflammatory and antioxidant effects and could be a potential new treatment for ACO.

**OBJECTIVES:** To investigate the effects of pep-BbKI treatment in a model of ACO and to compare to corticosteroid treatment. **METHODS:** Sixty-four male Balb/c mice (25-30g) were divided into eight groups: SAL (saline protocol), OVA (intraperitoneal and nebulization ovalbumin sensitization), ELA (intratracheal elastase), ACO (ovalbumin + elastase), ACO-pep-BbKI (OVA+ELA protocols and treated with pep-BbKI), ACO-DX (OVA+ELA treated with dexamethasone), ACO-DX-pep-BbKI (treated with dexamethasone and inhibitor pep-BbKI) and SAL-pep-BbKI (saline protocol treated with pep-BbKI). We evaluated: hyperresponsiveness to methacholine, exhaled nitric oxide (eNO), inflammatory cells from bronchoalveolar lavage and inflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ), remodeling markers (MMP-9, MMP-12, TGF- $\beta$ , collagen fibers), oxidative stress marker (iNOS), linear mean intercept (Lm) and signaling pathway NF-Kappa-B, in airways (AW) and alveolar septa (AS). We used One-Way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Holm-Sidak and test t for statistical analysis and considered significant  $p < 0.05$ .

**RESULTS:** There was an increase respiratory system resistance (%Rrs), airway resistance (%Raw), tissue resistance (%Gtis), Lm, total cells, eosinophils, macrophages, neutrophils, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MMP-9, MMP-12, TGF- $\beta$ , collagen fibers in ACO group compared to OVA and ELA ( $p < 0,05$ ). After treatment, with pep-BbKI and/or dexamethasone, there was an attenuation in the responses compared to ACO group ( $p < 0.05$ ). The ACO-pep-BbKI group reversed the alterations compared to SAL group for %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, %Htis, Lm, neutrophils, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  MMP-12 (AW), collagen fibers, iNOS (AW)

and eNO ( $p > 0.05$ ). ACO-DX reversed the alterations compared to SAL for %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, %Htis, Lm, total cells and differentials, IL-1 $\beta$ (AS), IL-5 (AS), IL-6 (AS), IL-10 (AS), IL-13 (AS), IFN- $\gamma$ , MMP-12 (AS), TGF- $\beta$  (AS), collagens fibers (AW), iNOS and eNO ( $p > 0.05$ ). The ACO-DX-pep-BbKI potentiated the decrease for MMP-12 (AS) compared to ACO-pep-BbKI and ACO-DX ( $p < 0.05$ ). The SAL group was similar to SAL-pep-BbKI for all comparisons ( $p > 0.05$ ), therefore we used SAL as control group. **CONCLUSIONS:** Treatments pep-BbKI and dexamethasone were similarly effective in reducing inflammation, remodeling, and oxidative stress on experimental model of ACO.

Keywords: Asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome.

Inflammation. Serine proteinase inhibitors. Bauhinia. Oxidative stress. Airway remodeling.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Sobreposição Asma-Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
pep-BbKI	Peptídeo <i>Bauhinia bauhinioides</i> Kallikrein Proteinase Inhibitor
BbCi	<i>Bauhinia bauhinioides</i> Cruzipain Inhibitor
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAT	Teste de Avaliação de DPOC
CrataBL	<i>Crataeva tapia bark lectin</i>
CVF	Capacidade Vital Forçada
CID10	Classificação Internacional das Doenças
DAB	Diaminobenzidina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPP	Elastase Pancreática Porcina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
FLBA	Fluido do Lavado Broncoalveolar
GINA	Global Initiative for Asthma
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
Gtis	Resistência do Tecido Pulmonar
Htis	Elastância do Tecido Pulmonar
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IP	Intraperitoneal
IT	Intratraqueal
Lm	Intercepto Linear Médio
LTB4	Leucotrieno 4
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase

mMRC	Conselho de Pesquisa Britânico Modificado
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-kappaB	Fator Nuclear KappaB
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOex	Óxido Nítrico Exalado
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PKa	Calicreína Plasmática
Raw	Resistência das Vias Aéreas
Rrs	Resistência do Sistema Respiratório
SUS	Sistema Único de Saúde
SF	Soro Fisiológico
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador - Beta
TIMP	Inibidor Tecidual da Metaloproteinase
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - Alpha
VEF1	Volume Expiratório Forçado ao Final do Primeiro Segundo

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) .....	1
1.2 Epidemiologia da Asma e DPOC .....	4
1.3 Fisiopatologia da Asma.....	4
1.4 Fisiopatologia da DPOC .....	6
1.5 Remodelamento de matriz extracelular na Asma e DPOC .....	7
1.6 Estresse Oxidativo na Asma e DPOC .....	9
1.7 Sobreposição Asma-DPOC (ACO) .....	11
1.8 Epidemiologia da ACO.....	12
1.9 <i>Bauhinia bauhinioides</i> Kallikrein Proteinase Inhibitor (BbKI).....	13
2 JUSTIFICATIVA .....	16
3 OBJETIVOS .....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Animais .....	18
4.2 Peptídeo sintético BbKI.....	18
4.3 Grupos Experimentais .....	18
4.4 Modelo Experimental de Asma .....	19
4.5 Modelo Experimental de Enfisema.....	19
4.6 Modelo Experimental de ACO .....	20
4.7 Tratamento com pep-BbKI .....	20
4.8 Tratamento com Dexametasona.....	21
4.9 Avaliação da Hiperresponsividade à Metacolina e Determinação do Óxido Nítrico Exalado.....	22
4.10 Coleta e Análise do Fluído Lavado Broncoalveolar (FLBA) .....	24
4.11 Estudos morfométricos .....	24
4.12 Análise imunohistoquímica.....	25
4.13 Avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm).....	27
4.14 Análise Estatística .....	27
5 RESULTADOS .....	28
5.2 Hiperresponsividade à Metacolina .....	28
5.2.1 Resistência do Sistema Respiratório (Rrs).....	28
5.2.2 Elastância do Sistema Respiratório (Ers).....	30
5.2.3 Resistência das Vias Aéreas (Raw).....	31
5.2.4 Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis) .....	32
5.2.5 Elastância do Tecido Pulmonar (Htis) .....	33
5.3 Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA) .....	34
5.3.1 Células Totais.....	34
5.3.2 Eosinófilos .....	35
5.3.3 Linfócitos .....	36

5.3.4 Macrófagos.....	37
5.3.5 Neutrófilos.....	38
5.4 Intercepto Linear Médio (Lm) .....	39
5.5 Marcadores Inflamatórios Imunohistoquímicos .....	40
5.5.1 Avaliação do número de células positivas para IL-1 $\beta$ nas vias aéreas .....	40
5.5.2 Avaliação do número de células positivas para IL-1 $\beta$ nos septos alveolares .....	41
5.5.3 Avaliação do número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas .....	42
5.5.4 Avaliação do número de células positivas para IL-4 nos septos alveolares .....	43
5.5.5 Avaliação do número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas .....	44
5.5.6 Avaliação do número de células positivas para IL-5 nos septos alveolares .....	45
5.5.7. Avaliação do número de células positivas para IL-6 nas vias aéreas .....	46
5.5.8. Avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares .....	47
5.5.9 Avaliação do número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas .....	48
5.5.10 Avaliação do número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares.....	49
5.5.11 Avaliação do número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas .....	50
5.5.12 Avaliação do número de células positivas para IL-13 nos septos alveolares.....	51
5.5.13 Avaliação do número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas .....	52
5.5.14 Avaliação do número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares.....	53
5.5.15 Avaliação do número de células positivas para IFN- $\gamma$ nas vias aéreas .....	54
5.5.16 Avaliação do número de células positivas para IFN- $\gamma$ nos septos alveolares.....	55
5.5.17 Avaliação do número de células positivas para TNF- $\alpha$ nas vias aéreas .....	56
5.5.18 Avaliação do número de células positivas para TNF- $\alpha$ nos septos alveolares .....	57
5.6 Marcadores de Remodelamento de Matriz Extracelular.....	58
5.6.1 Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas .....	58
5.6.2 Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares .....	59
5.6.3 Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas .....	60
5.6.4 Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares .....	61
5.6.5 Avaliação do número de células positivas para TGF- $\beta$ nas vias aéreas .....	62
5.6.6 Avaliação do número de células positivas para TGF- $\beta$ nos septos alveolares .....	63
5.6.7 Avaliação da porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas .....	64
5.6.8 Avaliação da porcentagem de fibras colágenas nos septos alveolares.....	65
5.7 Marcadores do Estresse Oxidativo .....	66
5.7.1 Avaliação do número de células positivas para iNOS nas vias aéreas.....	66
5.7.2 Avaliação do número de células positivas para iNOS nos septos alveolares .....	67
5.7.3 Medida do Óxido Nítrico Exalado (NOex).....	68
5.8 Fator de transcrição .....	69
5.8.1. Avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nas vias aéreas.....	69
5.8.2 Avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nos septos alveolares .....	70
5.9 Análise qualitativa .....	71
6 DISCUSSÃO .....	74
7 CONCLUSÃO .....	84

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS <sup>1</sup> .....	86
APÊNDICE.....	94



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

Asma é uma doença crônica, caracterizada por hiperresponsividade brônquica e inflamação pulmonar. Há vários fatores responsáveis pelo desencadeamento e predisposição à doença, sendo uma condição heterogênea, que envolve episódios agudos que são revertidos espontaneamente ou com tratamento. (Reddel *et al.*, 2009; Lemanske; Busse, 2010; GINA, 2022).

Asma é definida como uma doença multifatorial, acometendo todas as faixas etárias e sofrendo influências genéticas e ambientais. Assim, à medida que a doença se agrava, as vias aéreas 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).

As combinações desses processos ajudam a explicar os diferentes fenótipos de asma, a resposta ao tratamento e a história natural ao longo da vida de uma pessoa. (Lemanske; Busse, 2010; Holgate, 2012). Segundo a *Global Initiative for Asthma* (GINA) de 2022, a hiperresponsividade é a principal responsável pelos recorrentes episódios de sibilo, dispneia, uso da musculatura acessória e tosse, particularmente no período noturno e início da manhã. 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 clima, infecção por vírus respiratório.

Na maioria dos casos a origem da doença inicia-se na infância tendendo a desaparecer os sintomas na fase adulta. Os casos que os sintomas se iniciam na infância e cessam na adolescência são considerados indivíduos primariamente não atópicos. Se os sintomas persistem na adolescência e na fase adulta, estes são considerados indivíduos atópicos. No entanto, na fase adulta a doença pode estar latente e as recaídas podem acontecer ao longo da vida do indivíduo (Lemanske; Busse, 2010).

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é uma obstrução do fluxo aéreo geralmente progressiva, que resulta de uma resposta inflamatória anormal dos

pulmões, relacionado à inalação de partículas e gases tóxicos. É causada principalmente pelo tabagismo e pode causar consequências importantes por todo organismo. As alterações celulares nos brônquios devido ao processo inflamatório levam a bronquite crônica, com alterações nos bronquíolos e com consequente bronquite obstrutiva, além da disfunção no parênquima pulmonar e assim causar o enfisema pulmonar. Estas alterações nem sempre ocorrem juntas, mas evoluem em níveis diferentes ao longo do tempo (GOLD, 2022)

A inflamação crônica leva a mudança estrutural pulmonar, a perda do parênquima pulmonar e estreitamento das pequenas vias aéreas levam a perda de comunicação dos alvéolos às pequenas vias aéreas, o que diminui o recuo elástico do pulmão (GOLD, 2022). O enfisema pulmonar é caracterizado pela destruição da estrutura pulmonar, desde as paredes alveolares distais até os bronquíolos terminais. Anatomicamente esta alteração é observada por um alargamento anormal dos espaços aéreo distais até o bronquíolo terminal, e é irreversível. No exame clínico é possível observar taquipneia com o uso de musculatura acessória, pacientes tendem a ser magros, visualmente apresentar tórax em forma de barril e timpanismo, porém o exame físico pode ser normal (Presto, 2007; Friedman, 2008). Já pacientes em que predomina a bronquite crônica as características do indivíduo podem ser a obesidade, dispneia, cianóticos e podem apresentar sinais de insuficiência cardíaca (Friedman, 2008).

Fisiologicamente, na DPOC, os espaços aéreos formados promovem uma menor área para troca gasosa e piora na perfusão pulmonar pela distensão alveolar. Com a destruição das paredes alveolares e portanto perda do tecido elástico, a retração elástica é prejudicada, perde-se a tração radial durante a expiração, o que contribui para retenção de ar (Friedman, 2008).

Para o diagnóstico da DPOC é importante obter a anamnese, acompanhada do exame clínico e dados espirométricos. Os sintomas podem ser dispneia persistente e progressiva, tosse crônica intermitente nem sempre produtiva, mas que piora com esforço físico, e com relato de exposição aos fatores de risco, como o tabagismo (GOLD, 2022).

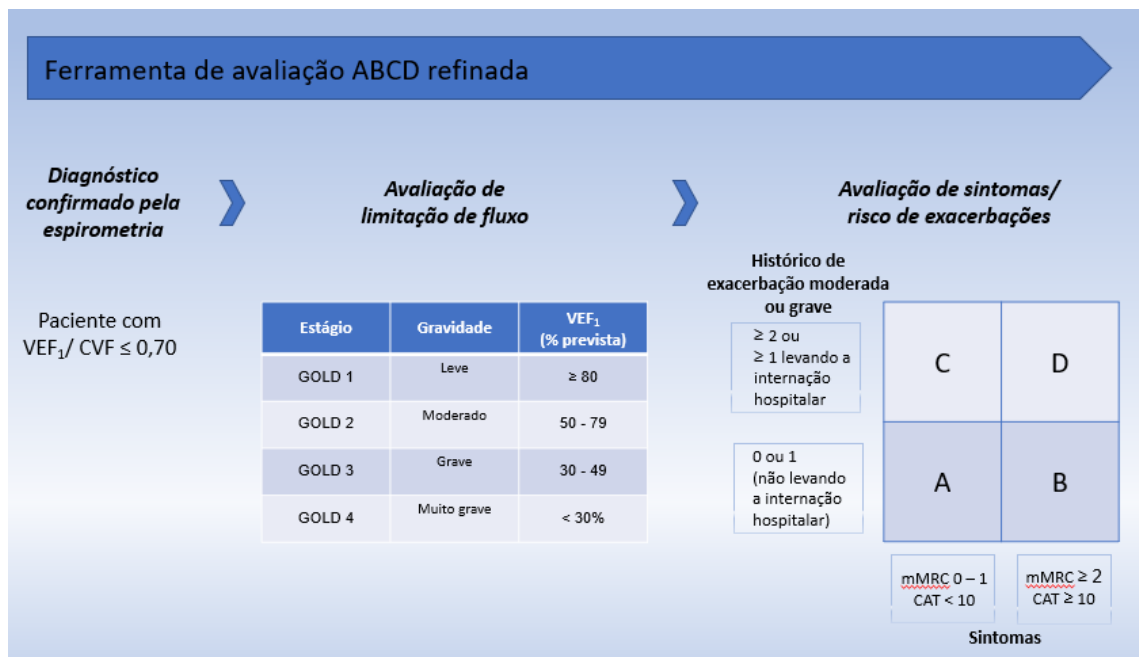
A avaliação clínica baseia-se nos sintomas e histórico de exacerbações, esta avaliação pode ser realizada com a ferramenta "ABCD", esta que surgiu na atualização do GOLD (2011), e considera alguns parâmetros que classifica os grupos de gravidade e auxilia na opção terapêutica. Para esta classificação de risco e

gravidade, além do número de exacerbações é também considerada a escala de sintomas, a “*Modified British Medical Research Council*” (mMRC) é uma avaliação com um questionário que classifica o sintoma de dispneia do estágio 0 ao 4; outra escala de sintomas é a *COPD Assessment Test* (CAT™) que também é aplicável ao paciente com 8 questões e a pontuação máxima é de 40. A partir destes dados é possível classificar o paciente nos grupos ABCD e tratar para prevenção de futuras exacerbações (GOLD, 2022)

A espirometria é o exame complementar para o diagnóstico da DPOC, a obstrução é definida 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.

A espirometria e a avaliação clínica em conjunto com o histórico de exacerbações, são informações cruciais para o diagnóstico, prognóstico e considerações terapêuticas. Esta nova abordagem de avaliação é ilustrada na Figura 1.

**Figura 1.** Esquema da avaliação ABCD revisado. Paciente é submetido a espirometria para determinar a gravidade da limitação de fluxo aéreo, também deve ser avaliado o grau de dispneia utilizando mMRC ou sintomas pelo CAT e, por último o histórico de exacerbações, incluindo o dado de hospitalização prévia.



## 1.2 Epidemiologia da Asma e DPOC

A prevalência da asma tem aumentado, está associada a crescente urbanização da população mundial, sendo que a prevalência global varia entre 1 – 18% da população nos diferentes países (GINA, 2022). Segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016 houve 417.918 mortes devido à asma à nível global, e foi estimado que mais de 339 milhões de pessoas tiveram asma em todo o mundo em 2016 (Global Health Metrics, 2017).

A prevalência da DPOC, segundo GOLD (2022), varia nas regiões do mundo, mas estima-se que em 2010 houve cerca de 384 milhões de casos, com prevalência global de 11,7%. Assim como uma análise sistemática de 2016 pelo *Burden Global of Disease study* estimou uma prevalência global de cerca 251 milhões de pessoas com diagnóstico de DPOC (Global Health Metrics, 2017). Mundialmente estima-se que cerca de 3 milhões de mortes anuais ocorrem por DPOC, e 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 pesquisa de morbidade hospitalar pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, no ano de 2019, segundo o DATASUS (2020), houve cerca de 119 mil casos de internações de adultos com asma e doenças de espectro obstrutivo e suas variantes, estes dados para pessoas acima de 20 anos, conforme a classificação internacional das doenças CID10. Enquanto que, ainda segundo o DATASUS (2020), de janeiro de 2020 a novembro do mesmo ano, casos de internações de adultos acima de 20 anos, por este mesmo CID10, chegaram a cerca de 72.797 mil. O declínio das internações por este diagnóstico pode estar relacionado ao ano da pandemia devido ao SARS-CoV-2 que causa a COVID-19, pois pacientes com asma e/ou DPOC que evoluem a óbito pelo COVID-19, foram notificados como óbito pelo vírus e não pelas doenças obstrutivas citadas.

## 1.3 Fisiopatologia da Asma

A pessoa que tem o diagnóstico de asma tem uma resposta exacerbada aos alérgenos, devido ao desencadeamento da resposta inflamatória, quando comparada a outras pessoas. Na mucosa brônquica encontram células dendríticas, estas têm um

papel importante no processo inicial de desencadeamento da asma, atuam como apresentadora de antígeno dando início a sensibilização. Esta resposta imunológica no pulmão pode ser suprimida pelos macrófagos, por meio da modulação das células dendríticas, este processo é conhecido como tolerização (Kuipers; Lambrecht, 2004; Brannan, 2010; Holgate, 2012).

Quando não ocorre a tolerização, a interação entre as células dendríticas e os linfócitos Th2 fazem com que os linfócitos B produzam imunoglobulina E (IgE), estas que quando liberadas na corrente sanguínea ligam-se a receptores de alta afinidade presente em mastócitos, iniciando uma resposta alérgica (Bousquet *et al.*, 2000; Holgate, 2012).

Após a fase de sensibilização, no segundo contato do indivíduo com o antígeno, grande parte dos asmáticos desenvolvem uma resposta inflamatória imediata e tardia. A fase imediata inicia logo após o contato com o antígeno, cerca de 2 a 4h após o contato, e a ativação de linfócitos B libera IgE, rápida ativação de mastócitos e macrófagos das vias aéreas. Nesta fase, a degranulação dos mastócitos, recrutamento de macrófagos e linfócitos T liberam mediadores inflamatórios (prostaglandinas, histaminas e cistenil-leucotrienos), este processo é principal causa da contração da musculatura lisa dos brônquios, e portanto um dos motivos da obstrução das vias aéreas (Bousquet *et al.*, 2000; Holgate, 2000; Lemanske; Busse, 2010).

As células dendríticas são ativadas pelos alérgenos, assim produzem citocinas, que atraem neutrófilos, monócitos para as vias aéreas além de transformar linfócitos TCD4+ em células de perfil Th2. Estes linfócitos Th2 organizam a cascata inflamatória, assim são liberadas interleucinas (IL) (IL-4, IL-5, IL-13). A IL-4 estimula os linfócitos a produzirem IgE, este se liga a superfície de mastócitos que contém proteoglicanos e podem contribuir liberando mais IL-4, IL-5, histaminas, leucotrienos e prostaglandinas. A IL-4 liberada por mastócitos perpetua a produção de IgE e assim a continuidade do processo inflamatório nas vias aéreas (Holgate, 2012).

Na fase tardia mais mediadores inflamatórios são recrutados para a via aérea como eosinófilos, células TCD4+, basófilos, neutrófilos e macrófagos. Ocorre cerca de 3-6h após o contato com o antígeno, podendo permanecer por vários dias. Este processo inflamatório é complexo, e há interação entre os mediadores inflamatórios e células das vias aéreas, o que é importante para o desenvolvimento de alterações

observadas no processo de remodelamento tecidual na asma brônquica (Bousquet *et al.*, 2000; Stone, 2010).

Nas vias aéreas as células epiteliais também têm um papel no processo inflamatório, são também fonte de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento. Assim como também estão envolvidas as células das glândulas mucosas e vasos sanguíneos. Estas células promovem inflamação, alteração vascular, aumento de secreção de muco, também da hiperresponsividade das vias aéreas, desprendimento epitelial, e obstrução do fluxo aéreo. Além desta alteração histopatológica, os leucócitos quando recrutados liberam leucotrienos (produto do metabolismo oxidativo) e também substâncias como metaloproteinases, fatores de crescimento, responsáveis também pelo remodelamento de matriz extracelular. Os mastócitos e eosinófilos liberam leucotrienos que são potentes broncoconstritores e potencializam a migração de eosinófilos para as vias aéreas, aumentando ainda mais a hiperresponsividade das vias aéreas (Vignola *et al.*, 2000; Hendeles *et al.*, 2004; Lemanske; Busse, 2010).

As citocinas estão envolvidas nos processos de sinalização das células, crescimento celular, diferenciação, proliferação, quimiotaxia, imunomodulação e apoptose. Elas se ligam a receptores na superfície celular, mais de 30 citocinas estão envolvidas na patologia da asma (Hamid; Tulic, 2009). O linfócito Th2, subclasse dos linfócitos T, tem papel importante em guiar o processo inflamatório, perpetuam também o remodelamento, principalmente pelo intermédio das citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Renauld, 2001). Dentre as citocinas pró-inflamatórias estão a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11, TNF $\alpha$ , entre as citocinas anti-inflamatórias estão fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (TGF $\beta$ ) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (Hamid; Tulic, 2009).

#### **1.4 Fisiopatologia da DPOC**

Fisiologicamente, o processo inflamatório crônico é uma característica importante da DPOC, pois a inflamação leva a uma mudança estrutural e estreitamento da luz brônquica. A destruição dos septos alveolares leva a perda do acoplamento alveolar e diminui, portanto, a perda do recolhimento elástico, o que diminui a capacidade das vias aéreas, durante a expiração, se manterem abertas (Barnes *et al.*, 2003).

Após iniciada a inflamação a mesma não cessa com a interrupção do fumo, acometendo as grandes e pequenas vias aéreas e levando a hiperplasia de células caliciformes e aumento das glândulas mucosas, além de infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos CD8+ (Barnes et al., 2003; GOLD, 2022). Dos mediadores inflamatórios, o mais comum é o TNF $\alpha$  que é produzido por macrófagos e também células do epitélio respiratório, estes mediadores intermediam uma forma de comunicação quimiotática (Tarantino, 2002).

A destruição do tecido pulmonar ocorre devido ao desequilíbrio de proteinases e antiproteinases. O tabagismo leva ao aumento do número de neutrófilos e macrófagos que liberam enzimas como: catepsinas, elastase neutrofílica, proteinase 3 e metaloproteinases (MMPs). Estas enzimas não são totalmente inibidas pelas antiproteinases, o que leva a destruição das células do parênquima pulmonar (Churg; Wright, 2005; Macnee, 2015; GOLD, 2022).

No lavado brônquico de pacientes com DPOC, encontram-se macrófagos que liberam muitos mediadores inflamatórios, como Leucotrieno (LTB<sub>4</sub>), TNF $\alpha$ , peptídeos quimiotáticos, elastase, catepsinas e MMPs, todos promotores de lesão pulmonar (Shapiro *et al.*, 2003). Destes mediadores inflamatórios, temos classes de proteinases, a serino, cisteíno e metaloproteinases, talvez as substâncias mais estudadas na patogênese da DPOC. Da classe serino, existem as proteinases 3, catepsina G e elastase neutrofílica que são armazenadas por exemplo por células polimorfonucleares e monócitos, estas células sofrem degranulação quando induzidas por mediadores pró-inflamatórios, consequentemente pode levar a destruição do tecido conectivo pulmonar e produção de muco (Owen; Campbell, 1999). Da classe cisteíno, existem as catepsinas S,B e L, serino-elastase que contribuem para degradação da matriz extracelular mediada por macrófagos. E, por último, as metaloproteinases (MMP 1, 2, 8 9 e 12), que além de promoverem degradação do colágeno e elastina, aumentam a expressão epitelial de MUC5, envolvidos na produção de muco (Churg *et al*, 2005; Deshmukh, 2005; Owen; Campbell, 1999).

### **1.5 Remodelamento de matriz extracelular na Asma e DPOC**

No tecido pulmonar, a matriz extracelular (MEC) é composta principalmente por fibras elásticas e colágenas, proteoglicanos, glicoproteínas, metaloproteinases e seus inibidores. Estes componentes da MEC são constituintes importantes do tecido

conectivo pulmonar, e sob condições inflamatórias, o desequilíbrio entre a injúria do tecido e o remodelamento do mesmo podem levar a uma alteração estrutural e consequente redução da funcionalidade pulmonar (Lazaar; Panettieri, 2003; Suki; Bates, 2008).

O colágeno I e III, são os principais componentes estruturais da parede alveolar no parênquima pulmonar, as fibras colágenas tipo I têm a característica de serem mais rígidas que a tipo III e, a relação entre elas (subtipo I/III) determina a resistência das fibras elásticas e sua capacidade de rompimento sob forças mecânicas (Suki; Bates, 2008). As fibras elásticas são compostas por microfibrilas e elastinas, são as principais responsáveis pelo recolhimento elástico dos pulmões. Estruturalmente, as fibras elásticas se ligam ao colágeno por meio de microfibrilas e proteoglicanos; a composição das microfibrilas por é de glicoproteínas, fibrilinas e TGF $\beta$  ligando estas proteínas. A manutenção da matriz extracelular tem como principal responsável o fibroblasto, este que sob a indução de TGF $\beta$  produz componentes da MEC (Ito *et al*, 2019).

O remodelamento das vias aéreas leva ao espessamento das paredes brônquicas, e isto acontece devido ao aumento de proteinases de matriz extracelular nas vias aéreas, que causam fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, também de glândulas submucosas (Johnson; Knox, 1997).

Na asma, além do processo inflamatório crônico que pode levar a remodelamento das vias aéreas, Grainge *et al.* (2011) sugere que as bronco constrições repetidas podem induzir a um estresse no epitélio que levam a mudanças estruturais da via aérea.

Nas pessoas com asma, a deposição anormal de fibras colágenas, elásticas e proteína de matriz são um dos motivos da alteração da matriz extracelular. Observa-se um espessamento da membrana basal reticular pelo do aumento de colágeno tipo I e III, tenascina e fibronectina, estas proteínas são ativadas pelos miofibroblastos e causam a fibrose subepitelial. Há também uma alteração da vascularização, com aumento do número e tamanho dos vasos sanguíneos. É evidenciado aumento em volume e número das glândulas mucosas, encontradas também no bronquíolos periféricos, onde comumente não existem, o que leva ao aumento de muco nas vias aéreas. As alterações no músculo liso das vias aéreas ocorrem por hipertrofia e hiperplasia, além disso pode ocorrer por um aumento da matriz extracelular dentro das camadas do músculo liso (James; Wenzel, 2007).



Estudos demonstram grande número de mastócitos nos feixes da musculatura lisa das vias aéreas pessoas com asma, o que mostra infiltração destas células e piora da função pulmonar. Um importante mediador expresso pelos mastócitos é a triptase, esta que é uma protease, estimula formação de fibroblastos e de células da musculatura lisa, que pode estimular síntese de colágeno tipo I por fibroblastos, estes principalmente por causa da sinalização de TGF $\beta$  (Akers *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2018). As metaloproteinases também desempenham um papel importante no remodelamento, por degradarem os componentes da MEC, elas são inibidas pelos inibidores tecidual da metaloproteinase (TIMP) que são produzidas por células mesenquimais (Murphy *et al.* 2011).

Na DPOC o desequilíbrio entre as proteinases e inibidores de proteinases estão envolvidos no processo de remodelamento tecidual. A resposta inflamatória crônica na DPOC está relacionada ao aumento no número de macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD4+ e CD8+ e fibroblastos nas vias aéreas, as quais têm um papel importante na ativação de proteinases, como as MMPs. O desequilíbrio entre as MMPs e seus inibidores contribuem com o dano tecidual e algumas das características do remodelamento pulmonar (Vignola *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2019). Acredita-se que as maiores mudanças nos componentes da MEC, como colágeno do subtipo I e III, e elastina estão envolvidas na perda de elasticidade durante a progressão do enfisema (Ito *et al.*, 2019).

## **1.6 Estresse Oxidativo na Asma e DPOC**

A poluição e o tabagismo crônico expõem a árvore brônquica a espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como células inflamatórias ativadas endogenamente como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, o que leva ao estresse oxidativo e injúria do tecido (Barnes, 2017). Este processo desencadeia a produção de outras EROs e peroxidação de lipídio e, conseqüente inflamação pulmonar (Rhaman, 2006).

Na asma há evidência de piora do estresse oxidativo demonstrado pelo aumento de concentrações de 8-isoprostano (produto do ácido aracdônico oxidado) e aumento de etano (produto da peroxidação de lipídios) no ar exalado de pacientes asmáticos. O estresse oxidativo está relacionado com a gravidade desta doença, e

ainda ao aumento da resposta inflamatória além da redução da responsividade da asma ao uso de corticosteroides (Barnes, 2017).

Na DPOC, o tabagismo é um dos principais fatores de risco, porém mesmo em ex-tabagistas o estresse oxidativo permanece alto devido produção endógena de células inflamatórias. Há redução de antioxidantes na DPOC, e as EROs ampliam a resposta inflamatória pela ativação de NF-kappaB, resultando no aumento da expressão de genes inflamatórios e proteinases. O estresse oxidativo também prejudica a função de anti-proteinases como as  $\alpha$ 1-antitripsina, e acelera a destruição de elastina no parênquima pulmonar (Barnes *et al.*, 2015; Barnes, 2017).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula, um radical livre que é capaz de reagir com outras moléculas como o oxigênio ( $O_2$ ), radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) ou metais de transição, assim formam os compostos reativos nitrogenados, que exercem funções fisiológicas no corpo humano e também a destruição de microrganismos (Ricciardolo, 2003).

O NO é responsável pela modulação do tônus brônquico, vascular e exsudação plasmática. O NO é produzido a partir da L-arginina com a ação da Óxido Nítrico Sintase (NOS), esta que apresenta três isoformas, sendo que duas são constitutivas e uma induzida. A forma induzida (iNOS) é estimulada por lipossacarídeos bacterianos ou por citocinas como  $TNF\alpha$ , a liberar grandes quantidades de NO em situações patológicas, que por sua vez perpetuam processo inflamatório (Bredt *et al.*; 1990; Lamas *et al.*, 1992; Prado *et al.*; 2005).

O NO está presente nos processos fisiológicos, seu papel depende da enzima responsável pela sua produção. Estudos sugerem que o NO derivado de enzimas neuronais (nNOS) podem ter benefícios na asma e DPOC por diminuir a contração da musculatura lisa brônquica (Bredt *et al.*, 1990). Prado *et al.*, (2005) relatam um aumento na expressão de iNOS em células linfomononucleares e eosinófilos presentes nas vias aéreas distais de animais com inflamação pulmonar alérgica crônica. Além disso, em outro estudo anterior observaram que a isoforma nNOS está presente nas células inflamatórias, e nos animais sensibilizados com ovalbumina encontraram maior número de células que expressam esta isoforma (Prado *et al.*, 2003).

A peroxidação da membrana lipídica produz isoprostano que são prostaglandinas ativas (PG) F2-like. Estas produzidas via peroxidação dos ácidos araquidônicos, formam estruturas isométricas, como o 8-iso-PGF2 $\alpha$ , este que pode

atuar na ligação dos receptores vascular tromboxane. Um potente oxidante peroxinitrito é formado pela interação do NO e superóxido. A formação de peroxinitrito leva a peroxidação e gera isoprostanos. Este é considerado a forma predominante gerada durante a ativação via do estresse oxidativo. Hoje o isoprostano, o PGF2 $\alpha$ , é considerado como marcador da injúria oxidante, são considerados potentes constritores do músculo liso, a sua produção está associada a alteração da permeabilidade vascular e também edema visto em cobaias, o que potencializa a obstrução brônquica (Fukunaga, 1993).

### **1.7 Sobreposição Asma-DPOC (ACO)**

Asma e DPOC são amplamente estudadas, entretanto nos últimos anos tem-se verificado uma variante dessas doenças, com características que se sobrepõe a ambas, com sintomas clínicos semelhantes aos que se encontram em DPOC, mas com significativa resposta ao uso de broncodilatadores. Assim esta clínica tem sido denominada Sobreposição Asma-DPOC (ACO) (Viegi *et al.*, 2007; GINA, 2022).

A hipótese alemã, como ficou conhecida, propõe que a DPOC e Asma são manifestações diferentes do mesmo processo de doença, já a hipótese britânica defende que as duas doenças são distintas, com processos fisiopatológicos diferentes entre si (Putcha; Wise, 2016).

Segundo a Global Initiative for Asthma (GINA, 2022), o termo ACO tem sido utilizado para descrever pacientes que têm limitação persistente do fluxo aéreo, juntamente com características clínicas comuns a ambas as doenças, asma e DPOC. Porém não é uma definição de uma única doença, mas um termo descritivo para uso clínico, que abrange diferentes fenótipos refletindo diferentes mecanismos subjacentes.

Sin *et al.* (2016) sugeriram alguns critérios para auxiliar na definição da ACO. Como critérios maiores, incluem a limitação fixa ao fluxo aéreo, com VEF1/CVF pós broncodilatador <0,7 ou abaixo do limite inferior de normalidade em indivíduos com idade igual ou maior a 40 anos, carga tabágica igual ou maior que 10 maços/ano ou equivalente exposição a biomassa e história documentada de asma antes dos 40anos de idade, ou resposta ao uso de broncodilatador (400mcg de salbutamol ou equivalente) com elevação de 400ml no VEF1. E elencados como os critérios menores, incluem história documentada de atopia ou rinite alérgica, resposta ao uso

de broncodilatador de elevação de 200ml e de 12% no FEV1 acima da linha de base em suas ou mais visitas e contagem de eosinófilos periféricos ou superior a 300 células/ $\mu$ L.

Apesar das diferentes definições, pacientes com critérios que correspondem a ACO têm mais sintomas respiratórios, maior comprometimento físico, pior qualidade de vida, além de alto risco de exacerbações e consequentemente maior número de hospitalizações (Maselli *et al.*, 2019).

Existem três características clínicas comuns nas doenças obstrutivas pulmonares: inflamação das vias aéreas, obstrução das vias aéreas e hiperreatividade brônquica. Na asma a inflamação crônica é considerada principalmente por um infiltrado eosinofílico e por células CD4+ (Ling *et al.*, 2016). Por outro lado, na DPOC é predominante a inflamação neutrofílica e conduzida por células CD8+ (King *et al.*, 2015). Porém, existem relatos na literatura que existem pacientes asmáticos não-eosinofílicos, e mostraram uma maior resistência aos corticosteroides (Pavord *et al.*, 1999). Há relatos de tabagistas com diagnóstico de asma com elevação do número de neutrófilos em suas vias aéreas, semelhante à DPOC. Fumar provoca inflamação neutrofílica que, por sua vez, promove o aumento da resistência aos corticosteroides, além disso pacientes com DPOC em uso de corticosteroides têm um risco aumentado de pneumonia (Pouwels *et al.*, 2006; Gafar *et al.*, 2018; Maselli *et al.*, 2019). Por outro lado, a inflamação eosinofílica é comumente observada em pacientes asmáticos e está correlacionada com maior reversibilidade da obstrução ao fluxo aéreo quando administrado corticosteroides. (Wu *et al.*, 2019). Com base nessas semelhanças e diferenças na definição e fisiopatologia da síndrome de sobreposição asma-DPOC, verificam-se necessárias mais investigações científicas relacionadas a esta doença.

## 1.8 Epidemiologia da ACO

Estima-se, por meio de estudos epidemiológicos, que a prevalência de pessoas diagnosticadas com sobreposição asma-DPOC varia entre 9% e 55% daqueles que tenham um dos diagnósticos de asma ou DPOC, com variação de gênero e idade. Por falta de definição clara e sustentada do diagnóstico de ACO, a ampla variação reflete diferentes critérios utilizados por diferentes pesquisadores (GINA, 2022)

Asma e DPOC diagnosticadas simultaneamente por médicos, segundo GINA (2022), tem sido relatada entre 15 a 32% em pacientes com um ou outro diagnóstico.

### **1.9 *Bauhinia bauhinioides* Kallikrein Proteinase Inhibitor (BbKI)**

As proteinases estão envolvidas na destruição dos componentes de matriz extracelular e da membrana basal. Assim como atuam nos mecanismos de adesão e mobilização celular, controle de apoptose além de ativar outras proteinases. Participam de processos fisiológicos, como reparo de tecido, ovulação, embriogênese e menstruação, bem como em processos patológicos como na destruição de tecidos, promovendo invasão tumoral por metástases, na fibrose, na DPOC, diferentes tipos de esclerose, etc. (Koks et al., 2000; Amalinei, 2010). Na asma as metaloproteinases (2,8,9 e 12) e inibidores tecidual de metaloproteinases de matriz (TIMP-1) são os principais envolvidos (Cataldo et al., 2003).

O cigarro e a elastase são as mais prováveis causas de destruição de tecido no enfisema. A elastina é degradada pela elastase, tem função importante no organismo, está presente em tecidos elásticos como pele, vasos e pulmão, ela apresenta um papel mecânico e estrutural nestes tecidos (Lee; Downey, 2001; Shapiro, 2002).

Os inibidores de proteinases, podem ser de origem vegetal ou animal, são de natureza proteica e capazes de produzir complexos com enzimas, sendo assim capazes de inibir competitivamente as atividades catalíticas (Richardson, 1991). Estes inibidores de proteinases são classificados em famílias, segundo a sua estrutura primária molecular. A Inibição pelos inibidores proteicos ocorre por uma ligação específica e restrita ao sítio reativo, pode ser reversível ou irreversível (Bode; Huber, 2000). Eles são capazes de inibir as enzimas proteolíticas ou aumentar os níveis de antiproteinases endógenas e podem contribuir para prevenção da progressão da doença (Barnes; Stockley, 2005). As proteinases são moléculas envolvidas em inúmeros processos fisiológicos, como a proliferação e morte celular, replicação de DNA, remodelamento celular, hemostasia, cicatrização, na resposta inflamatória e imune (Turk, 2006).

*Bauhinia* é um gênero de plantas, da subfamília Caesalpinodeae, coloquialmente conhecida como pata de vaca, devido ao formato da folha, e pode ser encontrada nas regiões tropicais pelo mundo, como África, Ásia e América do Sul, ilustrada na Figura 2. Inibidores de proteinase têm sido isoladas dos gêneros,

particularmente das sementes da espécie *Bauhinia bauhinioides*, que possuem calicreínas, e são chamadas de *Bauhinia bauhinioides* kallikrein inhibitor (BbKI) (Richardson, 1991; Oliva *et al.*, 1999). BbKI é um inibidor tipo Kunitz com uma massa molecular por volta de 18 kDa e uma inibição de constante aparente ( $K_{iap}$ ) de 2.4 nM para calicreína e 33 nM para plasmina (Oliva *et al.*, 1999; Araújo *et al.*, 2005).

O inibidor BbKI é um potente bloqueador de serino proteases, em especial da calicreína plasmática (PKa) humana, cuja uma das funções importantes é liberar as cininas envolvidas na inflamação (Bonturi *et al.*, 2022). As calicreínas são glicoproteínas encontradas por exemplo em células glandulares, neutrófilos. Em humanos, as calicreínas estão envolvidas em células e tecidos com funções reguladoras específicas, como transporte de íons, regulação do fluxo sanguíneo por meio da formação de cininas. As calicreínas plasmáticas e/ou teciduais estão envolvidas diretamente na progressão de tumores por meio do aumento de expressão e desregulação da proteólise (Yousef *et al.*, 2004; Oliva; Sampaio, 2009; Brito *et al.*, 2014). A inibição da PKa pelo BbKI provoca uma redução da liberação de bradicinina, pela diminuição de disponibilidade de PKa (Oliva *et al.*, 2001).

As proteinases não são mais somente consideradas proteínas de degradação de enzimas, tornaram-se importantes moléculas sinalizadoras envolvidas em vários processos biológicos vitais (Turk, 2006). Portanto diferentes inibidores de proteinases de origem vegetal têm sido estudados em modelos de asma e também de DPOC. Martins-Oliveira *et al.* (2016), mostraram que o tratamento com a proteína BbKI em um modelo experimental de enfisema induzido por elastase foi capaz de atenuar a hiperresponsividade pulmonar, a inflamação, o remodelamento tecidual e o estresse oxidativo no pulmão destes animais. Assim como como outros inibidores de proteinase, o *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) e o *Bauhinia Bauhinioides* Cruzipain Inhibitor (BbCI), mostraram resultados parecidos em seus usos terapêuticos em um modelo experimental de enfisema também induzido por elastase (Theodor-Júnior *et al.*, 2017; Almeida-Reis *et al.*, 2017).

Inibidores de proteinases também têm sido estudados em modelos experimentais de asma. Rodrigues *et al.* (2019) mostraram que EcTI atenuou a hiperresponsividade brônquica, remodelamento e estresse oxidativo em modelo experimental com camundongos, assim como Bortolozzo *et al.* (2018) obtiveram resultados similares quando estudaram o inibidor de peptidase *Crataeva tapia* bark (CrataBL) como tratamento para o controle da asma em modelo experimental.

Frente ao aumento da morbidade e mortalidade de pacientes portadores de asma e DPOC, que são associados ao desequilíbrio de proteinases e antiproteinases é notada a importância de busca de novas drogas por meio de modelos experimentais.

**Figura 2.** *Bauhinia bauhinioides* (Mart): (A) Ramos com vagens; (B) Ramos com flor; (C) Visão geral da árvore.



Fonte: Imagens retiradas do trabalho de Silva (2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estratégias terapêuticas envolvendo inibidores de proteinase têm sido estudadas para o tratamento da asma e DPOC. O pep-BbKI é um inibidor de tripsina, quimiotripsina e plasmina, e inibidores de proteinase inibem enzimas proteolíticas ou aumentam os níveis de antiproteinase endógena, assim podem contribuir para a prevenção da progressão da ACO (Oliva *et al.*, 2001; Barnes; Stockley, 2005). Portanto este estudo procura entender a fisiopatologia da sobreposição asma-DPOC (ACO), e também por meio de modelos experimentais a busca de novas estratégias terapêuticas, como o inibidor de proteinase de origem vegetal chamado pep-BbKI.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do tratamento com o peptídeo derivado da sequência primária de BbKI em um modelo experimental de ACO, avaliando a mecânica pulmonar e as alterações histopatológicas em vias aéreas e septos alveolares, e realizar a comparação com o tratamento de dexametasona.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliação na mecânica pulmonar:

a) **Hiperresponsividade à metacolina;**

Avaliação dos seguintes parâmetros nas vias aéreas e parênquima pulmonar:

b) **Resposta inflamatória:** recrutamento de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos, expressão celular de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), linfocinas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17) e citocinas anti-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-10);

c) **Avaliação de remodelamento da matriz extracelular:** fibras colágenas, TGF- $\beta$  e expressão celular de MMP-9 e MMP-12;

d) **Resposta de estresse oxidativo:** medida do NO exalado e expressão celular de iNOS;

e) **Mecanismos envolvidos:** expressão celular do NFkappaB.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 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 camundongos Balb/c para o modelo experimental de ACO. Os animais eram do sexo masculino, com idade de sete a oito semanas e com peso inicial de 25-30g, todos provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em um biotério com ciclo claro-escuro de 12h e foram tratados com água e ração. Os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH *publication* 85-23, revisado em 1985). Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Terapia Experimental I (LIM-20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### 4.2 Peptídeo sintético BbKI

O peptídeo que apresenta a sequência do sítio reativo de BbKI, provenientes da *Bauhinia bauhinioides*, foi desenhado e sintetizado com base na sequência da proteína de BbKI, para estabelecer a menor estrutura responsável pela função inibitória, e correlacionar à estrutura e especificidade de ação da proteína. O peptídeo, chamado de peptídeo-BbKI (pep-BbKI), cuja sequência é RPGLPVRFESPL foi sintetizado pela empresa *WatsonBio Science*, Texas, EUA, respeitando-se um grau de pureza igual ou superior a 98%, avaliado por cromatografia de fase reversa.

### 4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos de acordo com o protocolo que foram submetidos, com n=8 camundongos Balb/C para cada grupo. Houve perda de cinco animais, sendo quatro deles no meio do protocolo (um do grupo ACO, dois do grupo ELA e um do grupo SAL-pep-BbKI) e um animal durante a mecânica pulmonar (grupo SAL). Abaixo descrevemos os grupos experimentais:

**A) Grupo SAL:** Instilações intraperitoneais e inalações com soro fisiológico 0,9% (SF) estéril (n=7);

**B) Grupo OVA:** Instilações intraperitoneais e inalações com solução de ovoalbumina (OVA) (n=8);

**C) Grupo ELA:** instilação intratraqueal de elastase (n=6);

**D) Grupo ACO:** Instilações intraperitoneais e inalações com solução de OVA e instilações intratraqueais de elastase (n=7);

**E) Grupo ACO-pep-BbKI:** Instilações intraperitoneais e inalações com solução de OVA, instilação intratraqueais de elastase e tratamento com o pep-BbKI (n=8);

**F) Grupo ACO-DX:** Instilações intraperitoneais e inalações com solução de OVA, instilação intratraqueal de elastase e tratamento com dexametasona (n=8).

**G) Grupo ACO-DX-pep-BbKI:** Instilações intraperitoneais e inalações com solução de OVA, instilação intratraqueal de elastase, tratamento com dexametasona e tratamento com o pep-BbKI (n=8);

**H) Grupo SAL-pep-BbKI:** Instilações intraperitoneais e inalações com SF0,9% estéril, e tratamento com o pep-BbKI (n=7);

#### 4.4 Modelo Experimental de Asma

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina (OVA) teve duração de 28 dias, como mostra a Figura 3. Os camundongos receberam solução de 50mg de ovoalbumina (A-5378, *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA*) e de 6mg de Hidróxido de Alumínio (Pepsamar, *Sanofi-Synthelabo SA, RJ, Brasil*) por via intraperitoneal (IP) 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 0,9% (cloreto de sódio) na concentração de 10mg/mL (1%). O tempo em que os animais ficaram em contato com o aerossol foi de 30 minutos. Ao mesmo tempo, o Grupo Controle (SAL) recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (6 mg) por via intraperitoneal (IP) e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos (Toledo *et al.*, 2013).

#### 4.5 Modelo Experimental de Enfisema

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano inalado (Isofurine® 1mL/mL, Cristália LTDA, Itapira, SP, Brasil) e receberam por via intratraqueal (IT), no dia 21 do protocolo experimental, a instilação de elastase pancreática porcina (EPP) (E1250-500mg Elastase from porcine pancreas Type I,  $\geq 4$  units/mg protein, 41,7ml, 12mg protein/ml; 5 units/mg Protein, Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) na dose e concentração de 25 U EPP/100g de peso corporal dissolvido em 40  $\mu$ L de solução salina (Ikeda *et al.*, 2014). Todos os animais foram avaliados 7 dias após a instilação de elastase (Figura 3).

#### 4.6 Modelo Experimental de ACO

Os camundongos deste grupo experimental foram submetidos aos dois protocolos experimentais anteriormente descritos (modelo de asma e enfisema), com o objetivo de causar sobreposição das duas doenças, seguindo os protocolos de doses e datas (Toledo *et al.*, 2013; Ikeda *et al.*, 2014).

Portanto, os camundongos receberam solução de 50 mg de ovalbumina e 6 mg de Hidróxido de Alumínio por via IP 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 e submetidos à inalação de aerossol de OVA diluída em NaCl 0,9% na concentração de 10 mg/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 inalatório e instilada elastase pancreática porcina (EPP) IT na dose e concentração de 25 U EPP/100g de peso corporal dissolvido em 40  $\mu$ L de solução salina. Exemplificado na Figura 3.

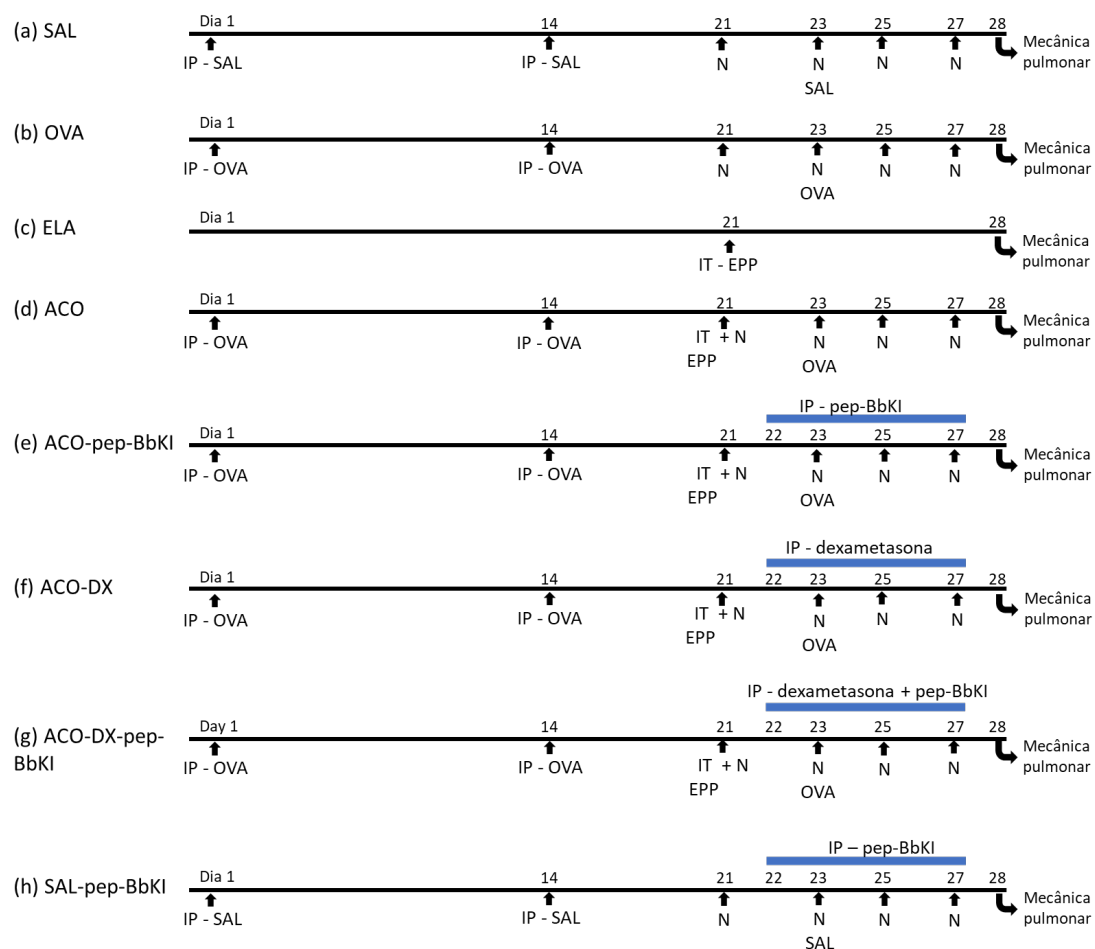
#### 4.7 Tratamento com pep-BbKI

O peptídeo BbKI foi administrado na dose de 2 mg/kg por via intraperitoneal nos dias 22, 23, 25 e 27 do protocolo experimental dos grupos que tinham tratamento, com início uma hora antes de cada administração de aerossol com ovalbumina do protocolo experimental de asma, ou salina no grupo controle. Esta dose de pep-BbKI foi baseada em estudos prévios de Brito *et al.* (2014). Protocolo exemplificado na Figura 3.

## 4.8 Tratamento com Dexametasona

A dexametasona (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil) foi administrada na dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal nos dias 22, 23, 25 e 27 do protocolo experimental dos grupos que tinham tratamento com corticosteroide, com início uma hora antes de cada administração de aerossol com ovalbumina no protocolo experimental de asma. Esta dose foi baseada no estudo de Toledo *et al.* (2013). (Figura 3).

**Figura 3.** Esquema do protocolo dos grupos experimentais. IP, intraperitoneal; IT, intratraqueal; N, nebulização; EPP, elastase pancreática porcina.



Fonte: produção do próprio autor, 2022.

#### 4.9 Avaliação da Hiperresponsividade à Metacolina e Determinação do Óxido Nítrico Exalado

Após 24 horas do término do protocolo experimental, no dia 28 do protocolo, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/kg IP) e traqueostomizados por meio de uma cânula de plástico e fixada com fio pelo orifício 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, em uma frequência respiratória de 150 ciclos/min e curva de fluxo inspiratório senoidal.

Quando o animal estava imóvel, iniciou-se a coleta de dados. Para a determinação do óxido nítrico (NO), o gás foi coletado por 10 minutos na porção expiratória do ventilador por meio de um balão impermeável ao óxido nítrico (*Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, EUA*). Após, os balões impermeáveis foram armazenados para posterior análise, por meio de quimioluminescência pelo analisador de resposta rápida (280 NOA- *Nitric Oxide Analyzer – Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, EUA*).

Após a coleta de NO exalado, os animais foram submetidos à avaliação da mecânica do sistema respiratório, hiperresponsividade à metacolina. Os valores de pressão gerados foram obtidos e a impedância de via aérea (Pressão/Fluxo) foi calculada como função das diferentes frequências produzidas. Usando uma janela de sobreposição de 75% no sinal de 16 segundos, 3 blocos de 8 segundos foram usados para o cálculo dos parâmetros da mecânica oscilatória, segundo a equação:

$$Z(f) = R_{aw} + i(2\pi f)I_{aw} + [G_{tis} - i.H_{tis}] / (2\pi f)\alpha.$$

Neste modelo, “Z(f)” é a impedância da via aérea em função da frequência, “i” é a unidade imaginária (-1.5), “f” é a frequência, “I<sub>aw</sub>” é a inertância de vias aéreas, e  $\alpha = (2/\pi) \cdot \arctan(H_{tis}/G_{tis})$ . Os parâmetros que buscamos para descrever o modelo pulmonar são R<sub>aw</sub> (resistência de vias aéreas maiores), G<sub>tis</sub> (resistência de vias aéreas menores ou tecidos) e H<sub>tis</sub> (elastância de tecidos pulmonares). Também foram

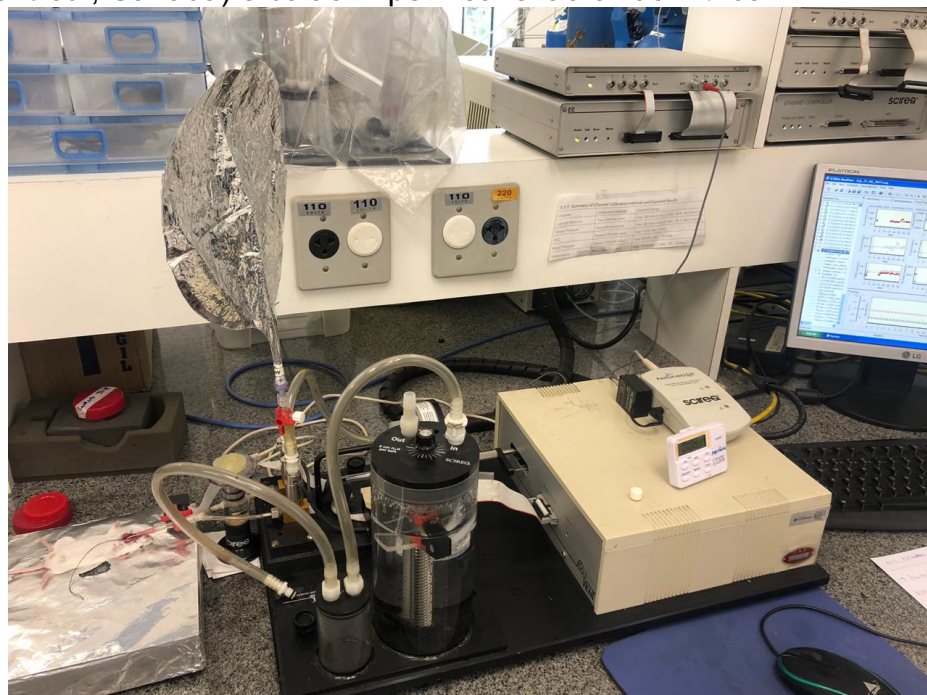
analisadas a Resistência do sistema respiratório ( $R_{rs}$ ) e Elastância do sistema respiratório ( $E_{rs}$ ), estes analisados segundo a equação de movimento:

$$Paw = FlowR + VolE + P0$$

Nesta equação, “Paw” (cmH<sub>2</sub>O) é a pressão da via aérea, medida na abertura da via aérea, “Flow” (mL/s) é o fluxo da via aérea, “R” é a Resistencia do Sistema Respiratório (cmH<sub>2</sub>O.s/mL), “Vol” (mL) é o volume do ar que entra no pulmão desde o início da inspiração, “E” (cmH<sub>2</sub>O/mL) é a Elastância do Sistema Respiratório e “P0” (cmH<sub>2</sub>O) é a pressão da via aérea no início da inspiração (Bates; Irvin, 2003, Biselli *et al.*, 2019).

Foi realizada a curva dose resposta à metacolina, contendo 3 doses da droga 3, 30 e 300 mg/mL, no primeiro, segundo e terceiro minutos, afim de avaliar a resposta broncoconstritora das vias aéreas e parênquima pulmonar, os resultados de tais medidas foram expressos em porcentagem de aumento em relação ao basal para as variáveis captadas por meio do ventilador mecânico. Após estes procedimentos, os animais foram exsanguinados pela artéria aorta e a análise do fluido lavado broncoalveolar (FLBA) foi realizada. Então, os pulmões foram removidos e fixados em uma pressão constante de 20cmH<sub>2</sub>O por 24h em 4% de formaldeído, para homogeneizar a distensão do parênquima pulmonar.

**Figura 4.** Aparelho de Ventilação mecânica para pequenos animais (*FlexiVent*, *Scireq*, *Montreal*, *Canadá*) e balão impermeável ao óxido nítrico.



Fonte: Imagem feita pelo próprio autor, no Laboratório Lim-20, 2020.

#### **4.10 Coleta e Análise do Fluido Lavado Broncoalveolar (FLBA)**

A coleta do FLBA foi realizada por intermédio da infusão de 0,5 mL de salina por três vezes consecutivas (total volume 1,5mL), pela cânula traqueal, com o uso de uma seringa. O volume recuperado foi centrifugado a 1000 rpm, a 5°C, por 10 minutos, e média de recuperação é de 80%. O botão celular é ressuspendido em 200 µL de salina. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o hemocitômetro de Neubauer (400x). Para a contagem diferencial, 100 µL 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 é determinada a partir do achado de 300 leucócitos/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) (Fukuzaki *et al.*, 2021). Ao final da coleta do lavado broncoalveolar, os pulmões foram removidos em blocos com o coração para os estudos morfométricos e análises histológicas/histoquímicas.

#### **4.11 Estudos morfométricos**

Para o estudo histopatológico, após a fixação com formaldeído 4% a uma pressão constante, os pulmões foram mantidos em álcool 70% por até 36 horas, e em seguida foram cortados em seu maior eixo, e também cortados no eixo transversal, onde é possível amostrar a árvore respiratória da melhor forma, para o processamento histológico de rotina.

Após a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 µm de espessura e fixadas em lâminas.

Os cortes das lâminas foram desparafinados, rehidratados e tratados com proteinase K por 20 minutos, a 37°C, seguidos por mais 20 minutos em temperatura ambiente, e então lavados com solução tampão salina (PBS). O bloqueio endógeno foi realizado por incubação com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) três vezes por 10 minutos.

Para a coloração de Picro-Sírius (fibras colágenas), após o processo de desparafinação descrito anteriormente, as lâminas foram coradas por 1 hora no Picro-Sírius à temperatura ambiente e posteriormente lavada 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.

Nós medimos as fibras colágenas na área total do parênquima pulmonar e em volta da via aérea, 10 a 12 campos microscópicos por pulmão. O cálculo foi realizado por meio de um microscópio óptico com auxílio de um analisador de imagem (*Image ProPlus 4.5 for Windows 98/NT/2000*), a medida da densidade óptica é o método para detectar as fibras colágenas. As imagens foram capturadas com uma ampliação de 400x por uma câmera digital Leica DFC 420 (Leica, Wetzlar, Alemanha) acoplado a um microscópio óptico DM2500 (Leica). As imagens foram enviadas a outro computador onde foram processadas pelo programa *Qwim Plus* (Leica) e a análise foi realizada pelo *Image ProPlus software* (NIH). O conteúdo do colágeno foi expresso por porcentagem, conforme a relação entre a quantidade de colágeno no espaço específico e a área total desse espaço (fração de volume).

#### **4.12 Análise imunohistoquímica**

As lâminas também foram preparadas para coloração por imunohistoquímica para avaliar a expressão celular de interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL- 4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, Interferon (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), metaloproteinase (MMP) 9 e MMP-12, fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), fator nuclear kappa B (NF-kappaB).

Os procedimentos imunohistoquímicos foram realizados conforme o estudo de Camargo *et al.* (2018). Os anticorpos utilizados como marcadores e suas diluições são mostrados na Tabela 1. A digestão do antígeno foi realizada em alta temperatura em uma panela de pressão por 1 minuto utilizando como tampão o citrato (pH 6.0). Para a incubação com anticorpo primário, eles foram diluídos em solução de *bovine serum albumin* (BSA) e aplicado a cada tecido na lâmina. Então, as lâminas foram incubadas por uma noite em uma câmara úmida a 4°C por 18-22h. Após, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (*Vector Laboratories, CA, EUA*) (Tabela 1). Para a visualização das células positivas, as lâminas foram lavadas com PBS e as proteínas foram visualizadas utilizando cromógeno diaminobenzidina (DAB) 70 mg DAB em 110 mL de Tris-HCl (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*) e contracorados com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha), por último as lâminas foram montadas com resina microscópica.

**Tabela 1.** Marcadores imunohistoquímicos, diluição final e especificações dos anticorpos.

Marcadores	Especificações dos anticorpos primários	Diluição	Anticorpos secundários	Especificações dos anticorpos secundários
IL-1 $\beta$	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- $\gamma$	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 $\alpha$	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 $\beta$	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.

Nota: IL, interleucina; IFN, Interferon; TNF, fator de necrose tumoral; MMP, metaloproteinase; TGF  $\beta$ , fator de crescimento transformador; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; NFKappaB, fator nuclear KappaB.

Para a análise morfométrica dos marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e remodelamento foi utilizada a técnica de contagem de pontos (Weibel, 2010) com o retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio óptico (E200Mv, Nikon Corporation, Tóquio Japão). A leitura e análise das vias aéreas foi realizada em quatro campos ao redor de três vias aéreas por animal e para o parênquima pulmonar foi realizada a análise de dez campos pulmonares aleatórios. 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

caem na área do tecido e, assim, realizando uma proporção de células positivas por área de tecido. A área total do retículo é de  $10^4\mu\text{m}^2$ , as análises são realizadas em aumento  $\times 1000$ , e o resultado expresso em células positivas/ $10^4\mu\text{m}^2$ . (Theodoro-Júnior *et al.*, 2017).

#### 4.13 Avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm)

Para a quantificação do LM foi utilizada a técnica de pontos (Weibel, 2010). O LM determina o índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais, permitindo indicar o grau de distensão alveolar (Margraf *et al.*, 1991). Foi feita a contagem de intersecções entre o parênquima pulmonar e as retas do retículo em quinze campos distintos, para cada animal, no parênquima pulmonar, em aumento de 200x, em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. O Lm foi calculado usando a equação:  $Lm = 2500 \mu\text{m} / \text{número de vezes que houve intersecção da reta e o septo alveolar}$  (Taguchi *et al.*, 2015). O retículo com área conhecida de 50 retas e 100 pontos foi acoplado no microscópio ótico (E200Mv, *Nikon Corporation*, Tóquio, Japão).

#### 4.14 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *SigmaPlot*® versão 11.0 (*Systat Software*, SPSS Inc., EUA). Foi utilizada a análise unidirecional de varância o teste *One Way ANOVA* seguido pelo método *Holm-Sidak* para comparação entre os grupos. Para a comparação entre os grupos controles SAL e SAL-pep-BbKI foi utilizado o teste t de student. Os dados paramétricos foram expressos na forma de média e erro padrão e o gráfico na forma de barras. Foi considerado estatisticamente significativo um  $p < 0.05$  para todas as análises.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos do peptídeo BbKI nos animais naive

Os resultados dos grupos SAL e SAL-pep-BbKI não apresentaram diferença entre si nas avaliações ( $p > 0,05$ ). Os dados de média e erro padrão para comparação entre os grupos SAL e SAL-pep-BbKI são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação dos resultados da hiperresponsividade à metacolina, fluido do lavado broncoalveolar, marcadores inflamatórios, remodelamento tecidual, marcadores do estresse oxidativo e fator de transcrição, nas vias aéreas e septos alveolares, dos grupos controles SAL e SAL-pep-BbKI

Hiperresponsividade à metacolina (%)	SAL	SAL-pep-BbKI	p*	Marcadores inflamatórios (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	SAL	SAL-pep-BbKI	p*
%Rrs	113,7 $\pm$ 14,8	161,0 $\pm$ 14,3	0,125	IL-1 $\beta$ - Vias Aéreas	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,407
%Ers	77,3 $\pm$ 7,5	52,7 $\pm$ 8,7	0,110	IL-1 $\beta$ - Septos alveolares	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,476
%Raw	96,4 $\pm$ 16,2	159,6 $\pm$ 35,9	0,106	IL-4 - Vias Aéreas	1,5 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,7	0,306
%Htis	39,0 $\pm$ 5,6	25,1 $\pm$ 2,8	0,137	IL-4 - Septos alveolares	1,7 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,4	0,940
%Gtis	54,4 $\pm$ 9,9	85,2 $\pm$ 13,6	0,091	IL-5 - Vias Aéreas	1,7 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	0,220
Lavado Broncoalveolar ( $\times 10^4$ células/mL)	SAL	SAL-pep-BbKI	p*	IL-5 - Septos alveolares	1,2 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,150
Células Totais	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,745	IL-6 - Vias Aéreas	0,7 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,1	0,838
Eosinófilos	0,2 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,03	0,221	IL-6 - Septos alveolares	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,927
Macrófagos	0,2 $\pm$ 0,03	0,1 $\pm$ 0,03	0,343	IL-10 - Vias Aéreas	2,1 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	0,701
Neutrófilos	0,1 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,03	0,410	IL-10 - Septos alveolares	3,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	0,084
Linfócitos	0,2 $\pm$ 0,05	0,1 $\pm$ 0,02	0,141	IL-13 - Vias Aéreas	1,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	0,768
Marcadores de remodelamento	SAL	SAL-pep-BbKI	p*	IL-13 - Septos alveolares	2,6 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,3	0,262
MMP-9 - Vias Aéreas (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	0,2 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,1	0,256	IL-17 - Vias Aéreas	2,1 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	0,138
MMP-9 - Septos alveolares (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,088	IL-17 - Septos alveolares	1,5 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	0,135
MMP-12 - Vias Aéreas (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	0,498	IFN- $\gamma$ - Vias Aéreas	0,7 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	0,125
MMP-12 - Septos alveolares (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,728	IFN- $\gamma$ - Septos alveolares	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,370
TGF- $\beta$ - Vias Aéreas (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,1	0,854	TNF- $\alpha$ - Vias Aéreas	1,7 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,9	0,077
TGF- $\beta$ - Septos alveolares (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	0,1 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,1	0,361	TNF- $\alpha$ - Septos alveolares	1,3 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	0,060
Fibras colágenas - Vias Aéreas (%)	1,6 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,5	0,553	Marcadores de estresse oxidativo	SAL	SAL-pep-BbKI	p*
Fibras colágenas - Septos alveolares (%)	2,4 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2	0,432	iNOS - Vias Aéreas (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	3,3 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,2	0,067
Fator de transcrição (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	SAL	SAL-pep-BbKI	p*	iNOS - Septos alveolares (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ )	2,6 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,4	0,751
NF-Kappa-B - Vias Aéreas	0,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2	0,343	Óxido nítrico exalado (ppb)	12,3 $\pm$ 2,1	18,5 $\pm$ 0,3	0,069
NF-Kappa-B - Septos alveolares	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,509				

Nota: Rrs, resistência do sistema respiratório; Ers, elastância do sistema respiratório; Raw, resistência das vias aéreas; Htis, elastância do tecido pulmonar; Gtis, resistência do tecido pulmonar; IL, interleucina; IFN, Interferon; TNF, fator de necrose tumoral; MMP, metaloproteinase; TGF  $\beta$ , fator de crescimento transformador; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; NFKappaB, fator nuclear KappaB. \*Valor de p.

Portanto, utilizaremos como grupo controle nas comparações com os animais dos grupos OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI apenas um controle, o grupo SAL, e assim facilitar a visualização nos gráficos.

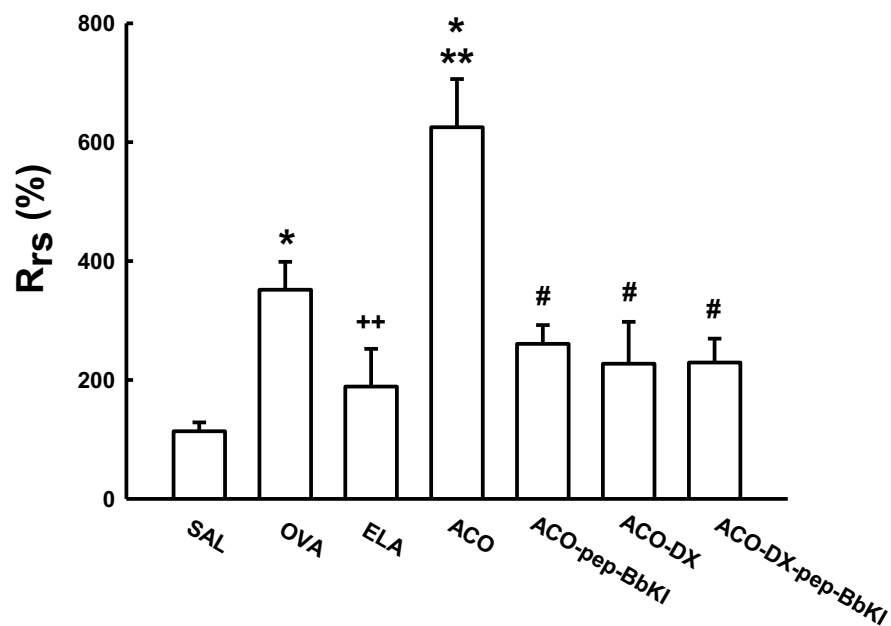
### 5.2 Hiperresponsividade à Metacolina

#### 5.2.1 Resistência do Sistema Respiratório (Rrs)

A **Figura 5** mostra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Rrs (%Rrs) após teste com metacolina nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento da %Rrs nos grupos OVA e ACO

comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Observamos também aumento da %Rrs no grupo ACO quando comparado aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Além disso, houve reversão total da %Rrs nos grupos ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI 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).

**Figura 5.** Porcentagem máxima de aumento da Rrs após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

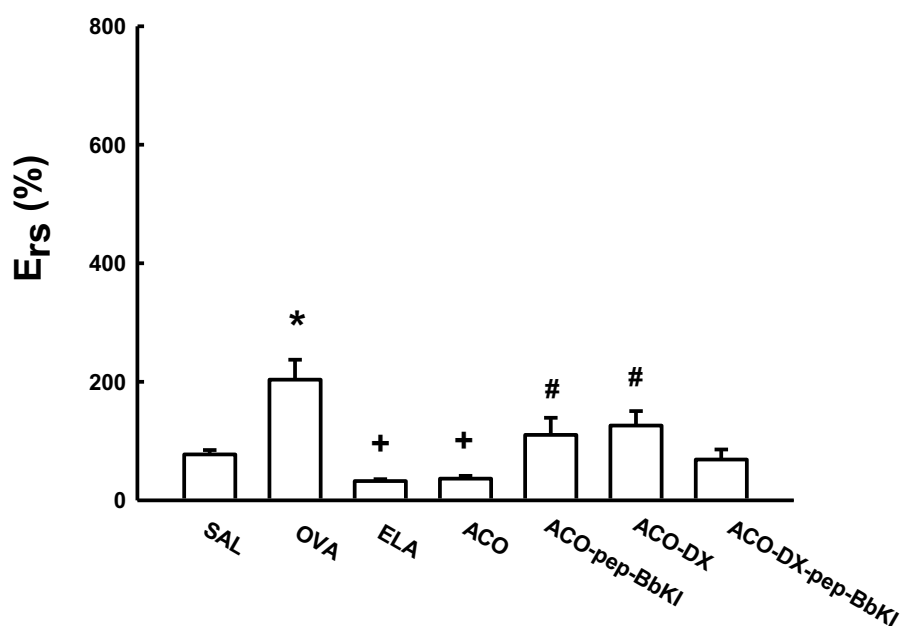


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.2.2 Elastância do Sistema Respiratório (Ers)

A **Figura 6** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Ers (%Ers) após metacolina nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento da %Ers no grupo OVA comparado ao grupo SAL ( $p < 0,05$ ), e houve redução da %Ers nos grupos ELA e ACO comparados aos grupos SAL e OVA ( $p < 0,05$  para todas as comparações). A resposta de ELA e ACO não foram diferentes. O grupo tratamento ACO-DX-pep-BbKI não foi diferente do grupo ACO ( $p > 0,05$ ). Os grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX reverteram totalmente as alterações da %Ers pois foram diferentes do grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações) e semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 6.** Porcentagem máxima de aumento da Ers após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

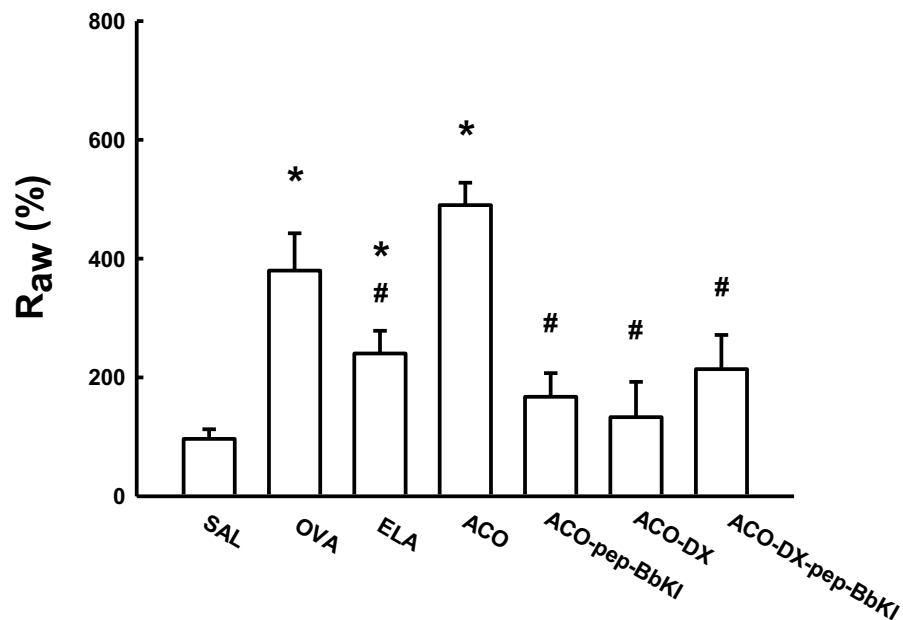


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; + $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.2.3 Resistência das Vias Aéreas (Raw)

A **Figura 7** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Raw (%Raw) nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento da %Raw nos grupos OVA, ELA e ACO, quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO foi superior ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Houve reversão total das alterações da %Raw nos grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI pois foram diferentes do grupo ACO ( $p < 0,05$ ) e semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ).

**Figura 7.** Porcentagem máxima de aumento da Raw após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

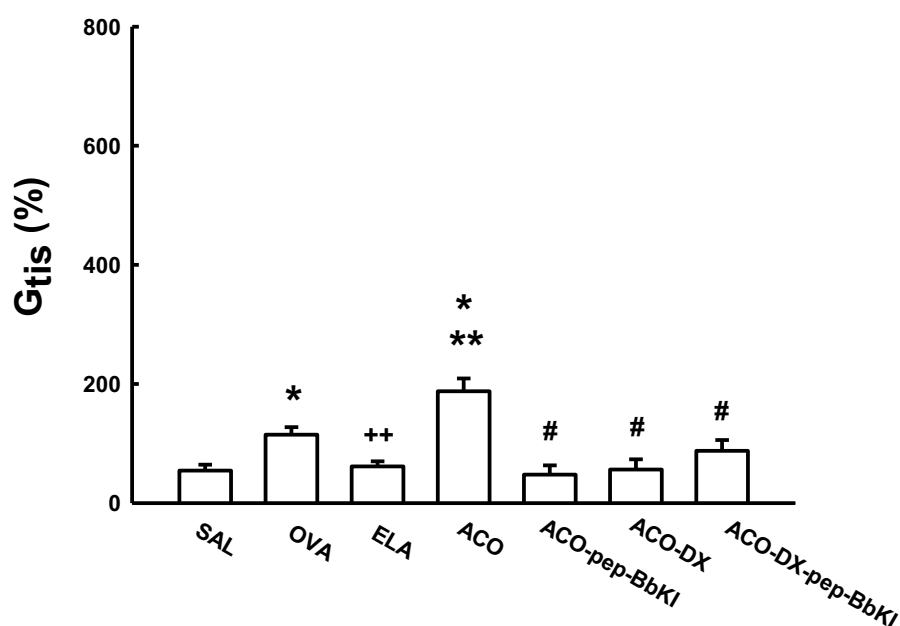


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.2.4 Resistência do Tecido Pulmonar (Gtis)

A **Figura 8** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento da Gtis (%Gtis) após metacolina nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento da %Gtis nos grupos OVA e grupo ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Observamos aumento da %Gtis no grupo ACO quando comparado aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Além disso, houve uma reversão total da alteração da %Gtis nos grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI 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).

**Figura 8.** Porcentagem máxima de aumento da Gtis após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



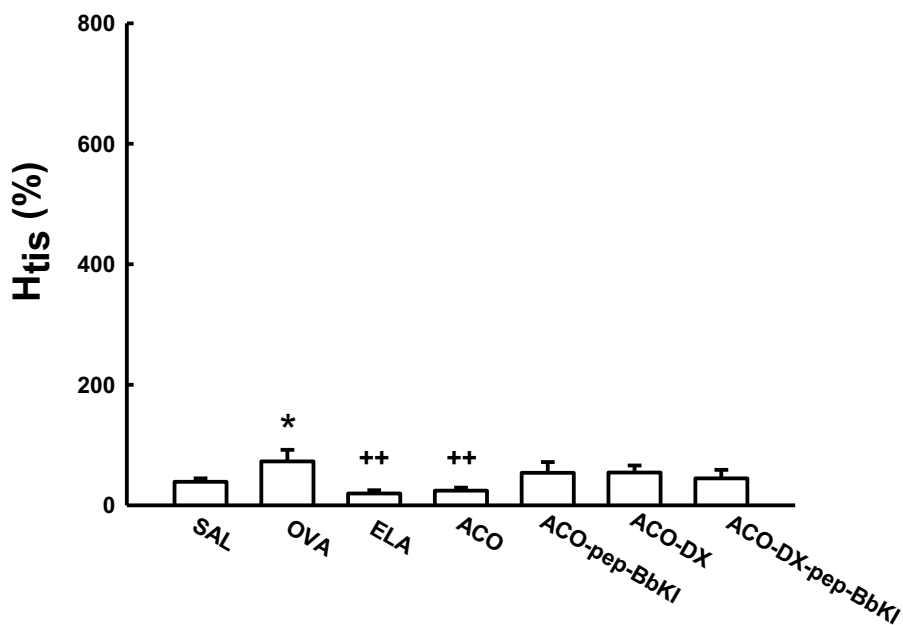
Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.



### 5.2.5 Elastância do Tecido Pulmonar (Htis)

A **Figura 9** demonstra a avaliação da porcentagem máxima de aumento após metacolina da Htis nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Observamos que os grupos ELA e ACO não foram diferentes do grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações). Houve aumento da %Htis no grupo OVA comparado ao grupo SAL ( $p < 0,05$ ). Houve uma diminuição da %Htis nos grupos ELA e ACO quando comparados ao grupo OVA ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI não foram diferentes dos grupo SAL e ACO ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 9.** Porcentagem máxima de aumento da Htis após desafio com metacolina dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



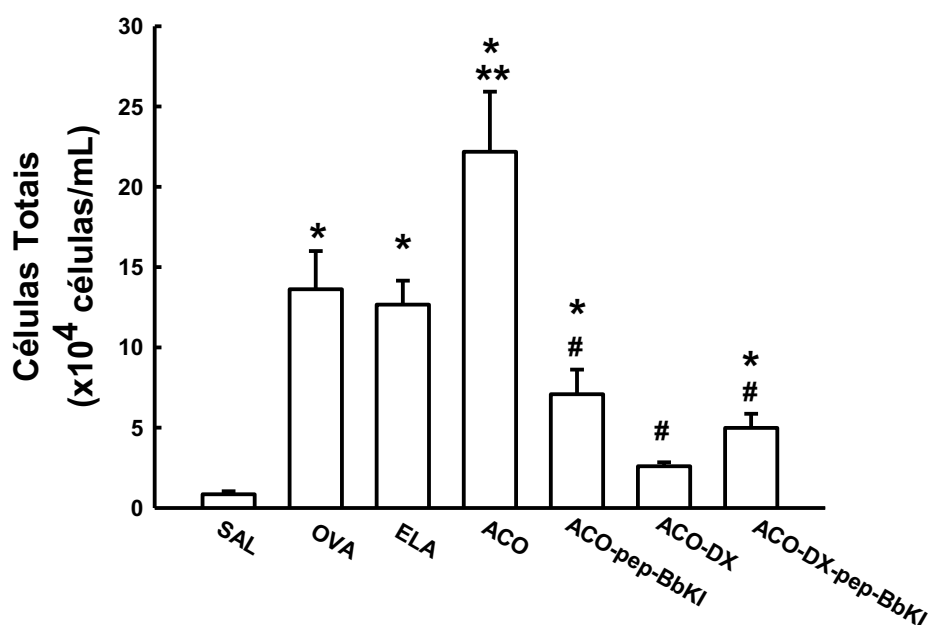
Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA.

### 5.3 Fluido do Lavado Broncoalveolar (FLBA)

#### 5.3.1 Células Totais

A **Figura 10** demonstra a contagem de células totais presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento da quantidade de células totais nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Houve também aumento de células totais no grupo ACO quando comparado aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Houve atenuação na alteração do número de células totais nos grupos tratamentos ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  ambas as comparações), visto que estes grupos foram diferentes de SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO-DX apresentou reversão total das alterações pois foi diferente do grupo ACO ( $p < 0,05$ ), e foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ).

**Figura 10.** Número de células totais ( $\times 10^4$  células/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

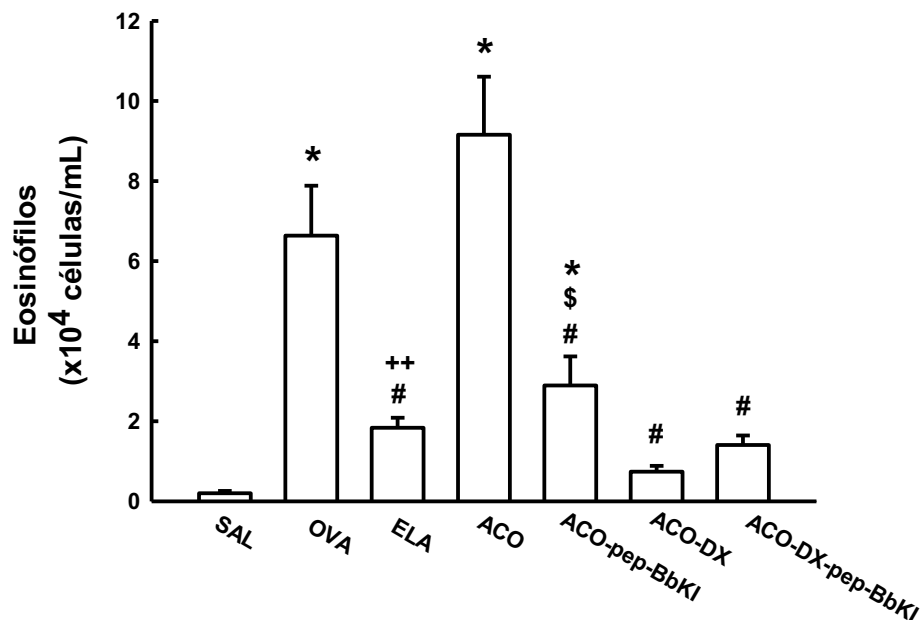


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.3.2 Eosinófilos

A **Figura 11** demonstra a contagem de eosinófilos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento dos eosinófilos no grupo OVA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Houve aumento no grupo ACO quando comparado ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Houve atenuação da alteração do número de eosinófilos no grupo ACO-pep-BbKI em comparação ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi diferente de SAL ( $p < 0,05$ ). Os grupos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), visto que foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ) para todas as comparações). Encontramos diferença entre dois grupos tratamento, ACO-DX mostrou menor número de eosinófilos comparado a ACO-pep-BbKI e ( $p < 0,05$ ).

**Figura 11.** Número de eosinófilos ( $\times 10^4$  células/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

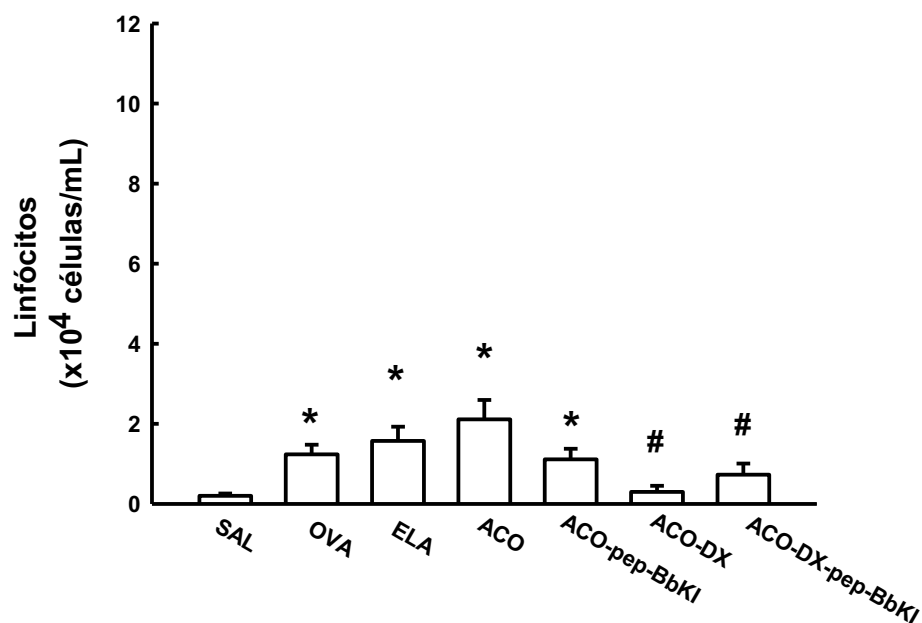


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.3.3 Linfócitos

A **Figura 12** demonstra a contagem de linfócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento de linfócitos nos grupos OVA, ELA, ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO não foi diferente dos grupos OVA e ELA ( $p > 0,05$  para ambas as comparações). Não houve diferença do grupo ACO-pep-BbKI comparado ao grupo ACO ( $p > 0,05$ ), mas foi diferente do grupo SAL ( $p < 0,05$ ). Houve reversão total da alteração do número de linfócitos nos grupos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 12.** Número de linfócitos ( $10^4$  células/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

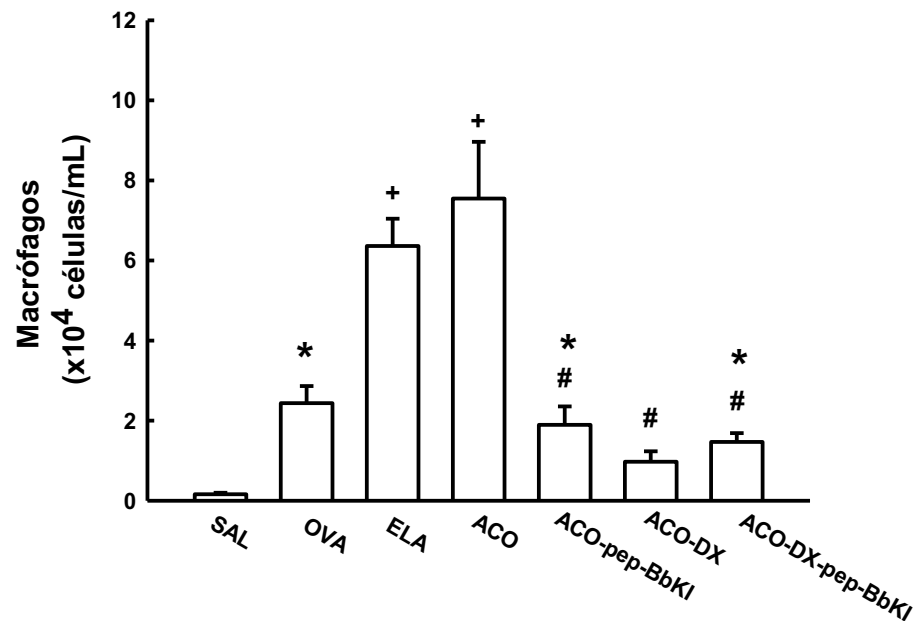


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL. # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.3.4 Macrófagos

A **Figura 13** demonstra a contagem de macrófagos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento na contagem de macrófagos nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO apresentou aumento do número de macrófagos comparado ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ). Nos grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI houve atenuação da alteração do número de macrófagos comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO-DX reverteu totalmente as alterações pois foi diferente do grupo ACO ( $p < 0,05$ ) e semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ).

**Figura 13.** Número de macrófagos ( $\times 10^4$  células/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

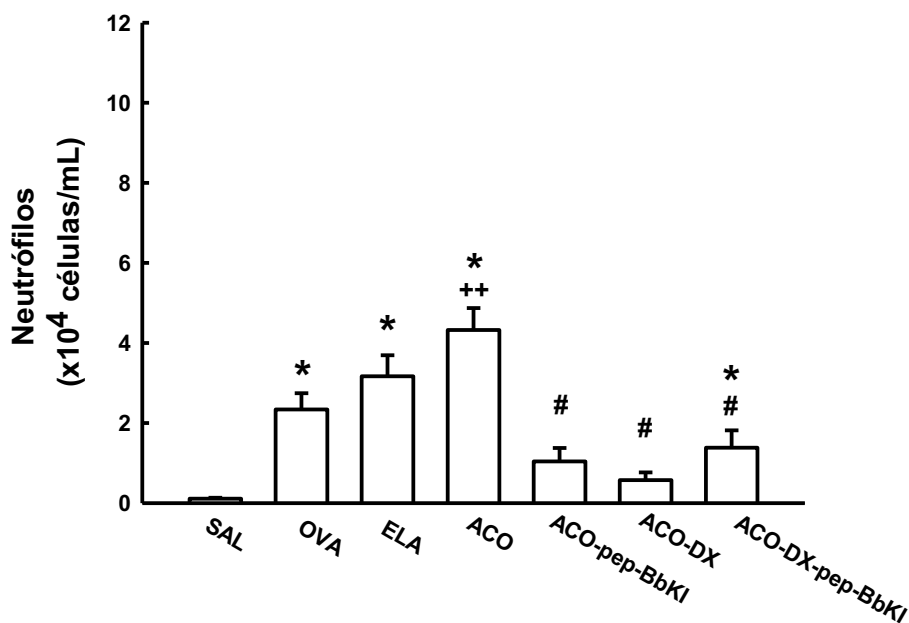


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA.; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.3.5 Neutr3filos

A **Figura 14** demonstra a contagem de neutr3filos presentes no fluido do lavado broncoalveolar nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento de neutr3filos nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as compara33es). O grupo ACO mostrou maior contagem de neutr3filos em compara33o ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ). Nos grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX houve revers3o total das altera33es de neutr3filos em compara33o ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as compara33es) pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as compara33es). O grupo ACO-DX-pep-BbKI apresentou atenua33o do n3mero de neutr3filos comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois tamb3m foi diferente do grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as compara33es).

**Figura 14.** N3mero de neutr3filos ( $\times 10^4$  c3lulas/mL) no fluido do lavado broncoalveolar dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

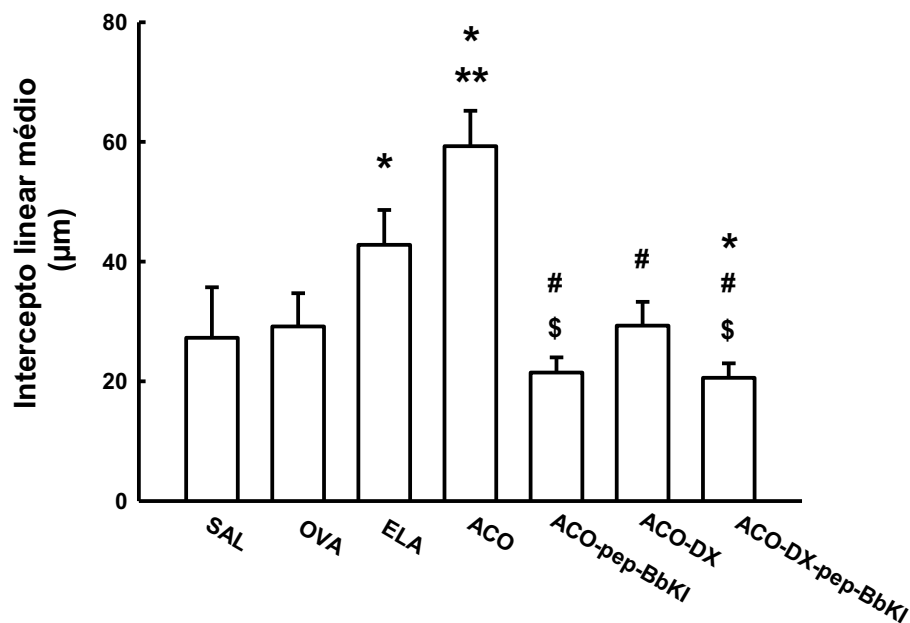


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

#### 5.4 Intercepto Linear Médio (Lm)

Na **Figura 15** temos a avaliação do Intercepto Linear Médio (Lm) nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento do Lm no grupo ELA e ACO quando comparados com o grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO é diferente de OVA e ELA ( $p < 0,05$ ). O Lm nos grupos tratados, ACO-pep-BbKI e ACO-DX reverteram totalmente as alterações quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO-DX-pep-BbKI atenuou as alterações comparado a ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi diferente de SAL ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos tratados houve diferença, os grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI apresentaram menor destruição do septo alveolar quando comparados ao grupo ACO-DX ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 15.** Gráfico dos valores do intercepto de Lm ( $\mu\text{m}$ ) dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL.



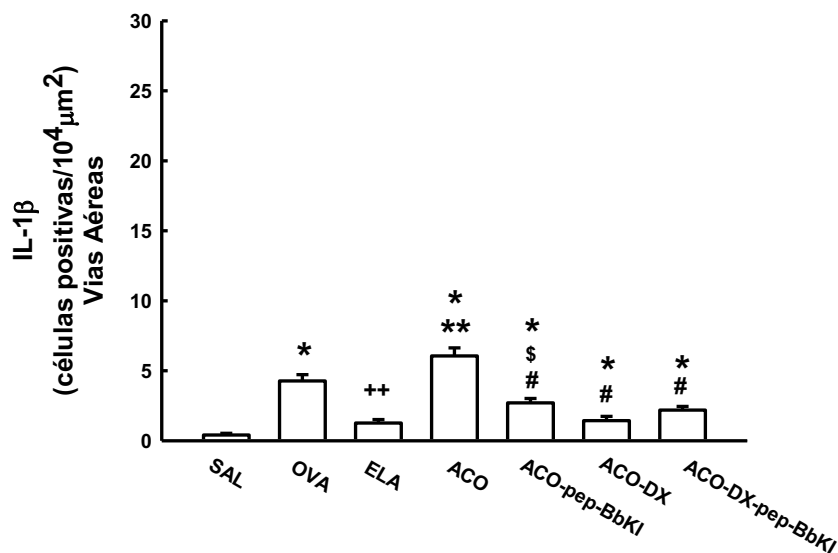
Nota: \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.

## 5.5 Marcadores Inflamatórios Imunohistoquímicos

### 5.5.1 Avaliação do número de células positivas para IL-1 $\beta$ nas vias aéreas

A **Figura 16** demonstra a contagem de células positivas para IL-1 $\beta$  nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Foi observado aumento destas células positivas nos grupos OVA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-1 $\beta$  em relação aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações do número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO-DX apresentou maior atenuação na contagem de células positivas para IL-1 $\beta$  do que ACO-pep-BbKI ( $p < 0,05$ ).

**Figura 16.** Número de células positivas para IL-1 $\beta$  (células/10<sup>4</sup> $\mu$ m<sup>2</sup>) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



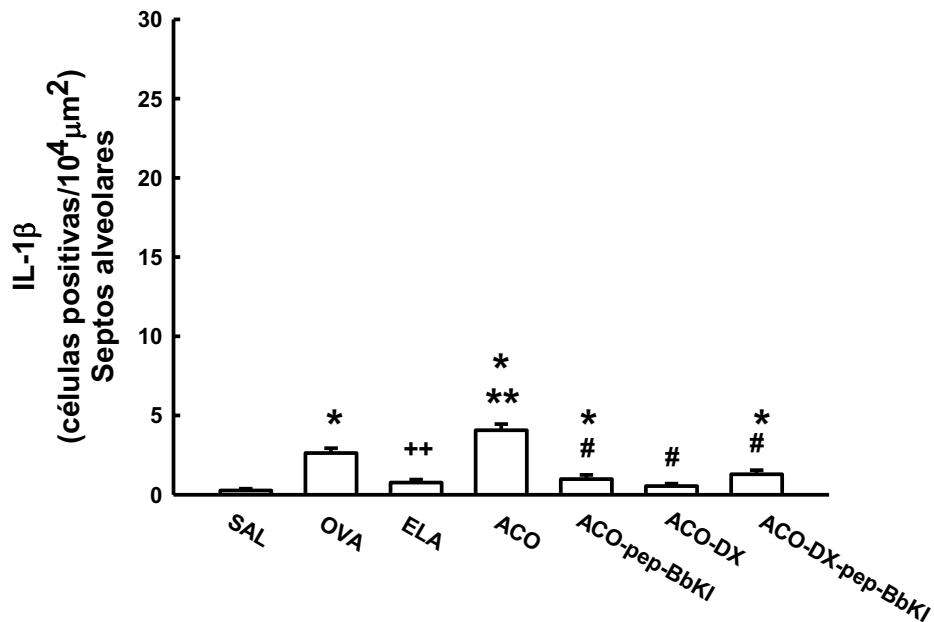
Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-DX.



### 5.5.2 Avaliação do número de células positivas para IL-1 $\beta$ nos septos alveolares

A **Figura 17** demonstra a contagem de células positivas para IL-1 $\beta$  nos septos alveolares dos grupos experimentais. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-1 $\beta$  em relação aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações em número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo com tratamento com corticosteroide ACO-DX reverteu totalmente as alterações para IL-1 $\beta$  comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ).

**Figura 17.** Número de células positivas para IL-1 $\beta$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

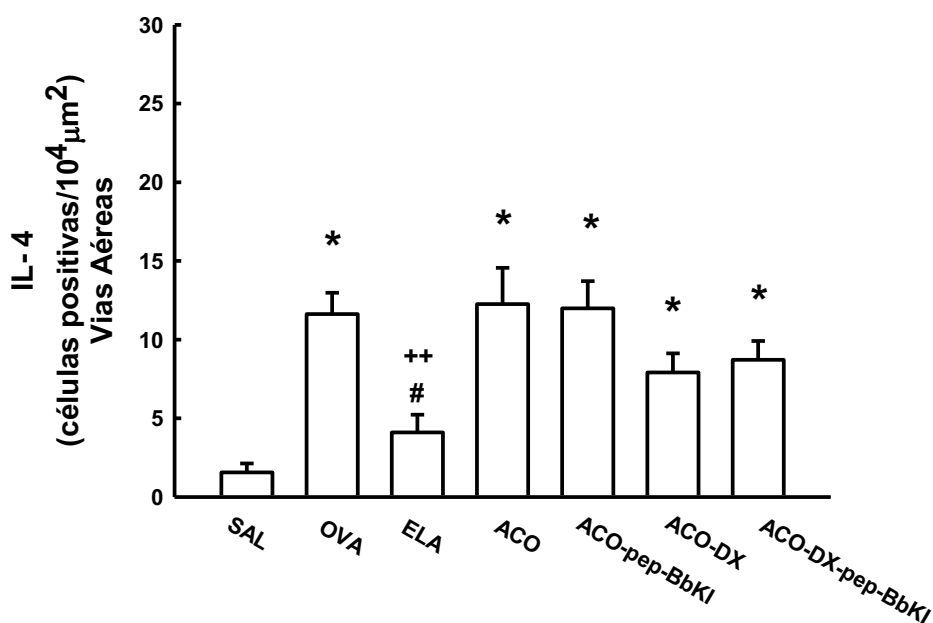


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO.

### 5.5.3 Avaliação do número de células positivas para IL-4 nas vias aéreas

A **Figura 18** demonstra a contagem de células positivas para IL-4 nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). A contagem no grupo ACO foi superior comparado ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI não foram diferentes do grupo ACO ( $p > 0,05$  para todas as comparações), e foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 18.** Número de células positivas para IL-4 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

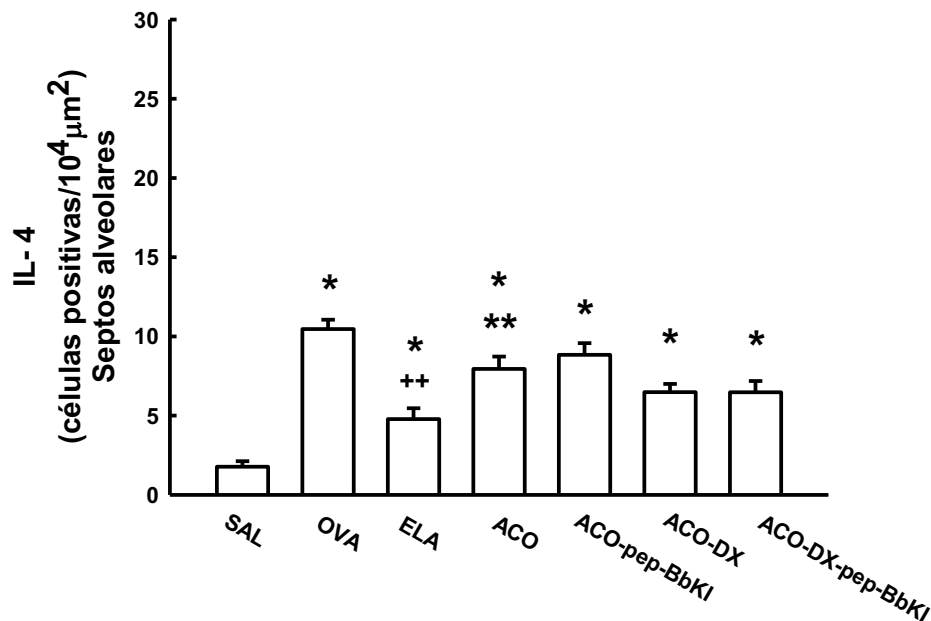


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

#### 5.5.4 Avaliação do número de células positivas para IL-4 nos septos alveolares

A **Figura 19** demonstra a contagem de células positivas para IL-4 nos septos alveolares nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Os grupos OVA e ELA foram diferentes do grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), onde OVA expressou mais células positivas do que ACO, e ELA menor expressão destas células do que ACO. Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI não foram diferentes quando comparados ao grupo ACO ( $p > 0,05$  para todas as comparações), e foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 19.** Número de células positivas para IL-4 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

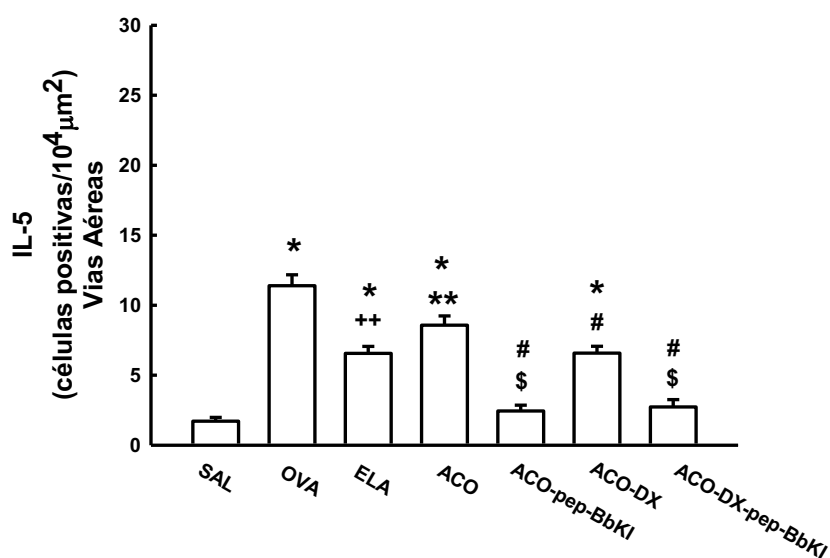


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA.

### 5.5.5 Avaliação do número de células positivas para IL-5 nas vias aéreas

A **Figura 20** demonstra a contagem de células positivas para IL-5 nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO apresentou menor expressão de células positivas para IL-5 do que o grupo OVA ( $p < 0,05$ ), porém maior expressão destas células do que o grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento que contém o inibidor, ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI revertem totalmente as alterações do número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois não foram diferentes de SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO-DX atenuou as alterações destas células com diminuição de células positivas para IL-5 comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), visto que este grupo foi diferente de SAL ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos tratamento, ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI foram diferentes do grupo ACO-DX ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 20.** Número de células positivas para IL-5 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

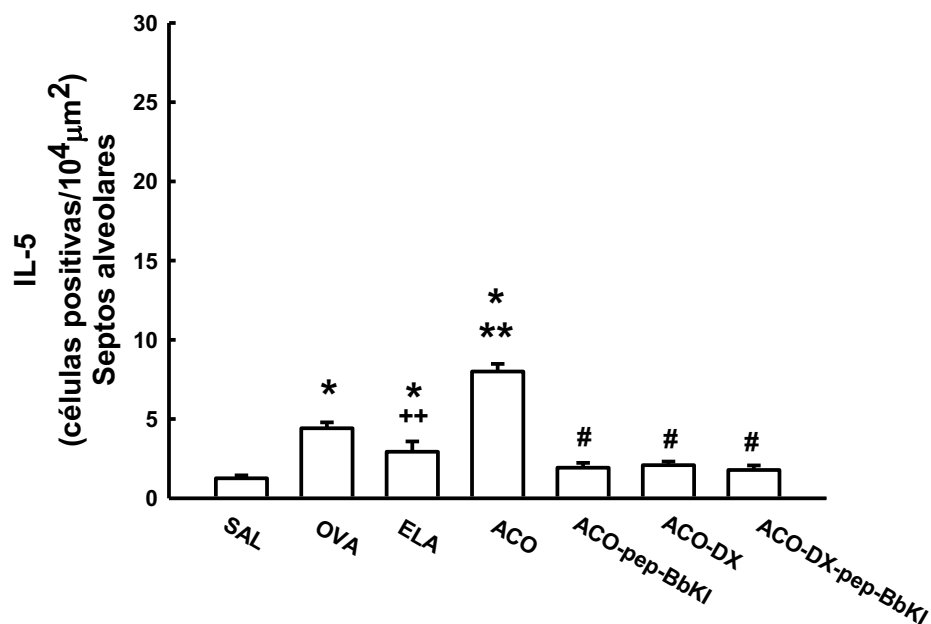


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.5.6 Avaliação do número de células positivas para IL-5 nos septos alveolares

Na **Figura 21** temos a contagem de células positivas para IL-5 nos septos alveolares nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve um aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas 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-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações em número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 21.** Número de células positivas para IL-5 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

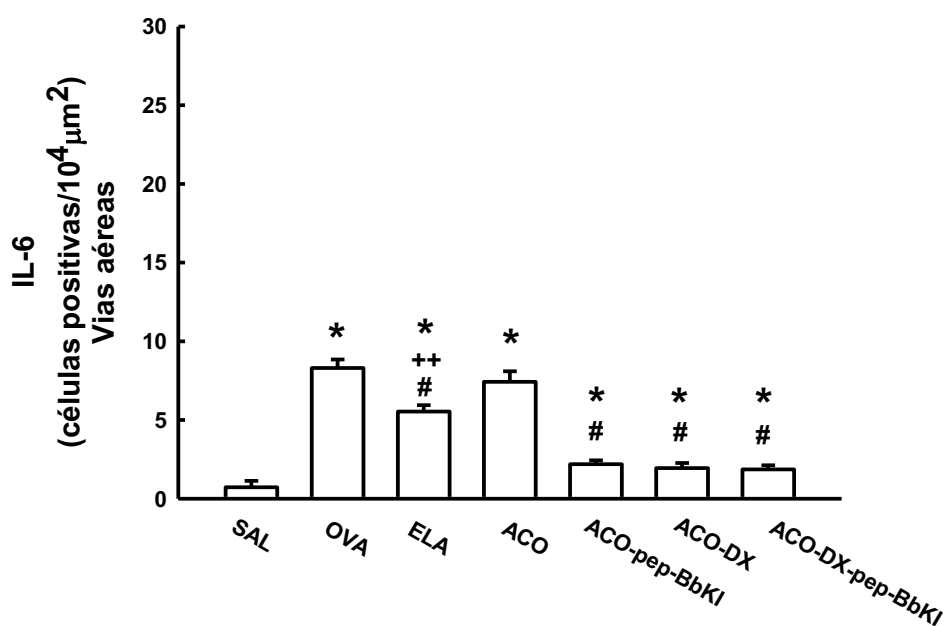


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \*\*+ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.5.7. Avaliação do número de células positivas para IL-6 nas vias aéreas

A **figura 22** mostra a avaliação do número de células positivas para IL-6 nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento na expressão destas células em todos os grupos OVA, ELA e ACO comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IL-6 em comparação ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações destas células positivas para IL-6 quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas comparações).

**Figura 22.** Número de células positivas para IL-6 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

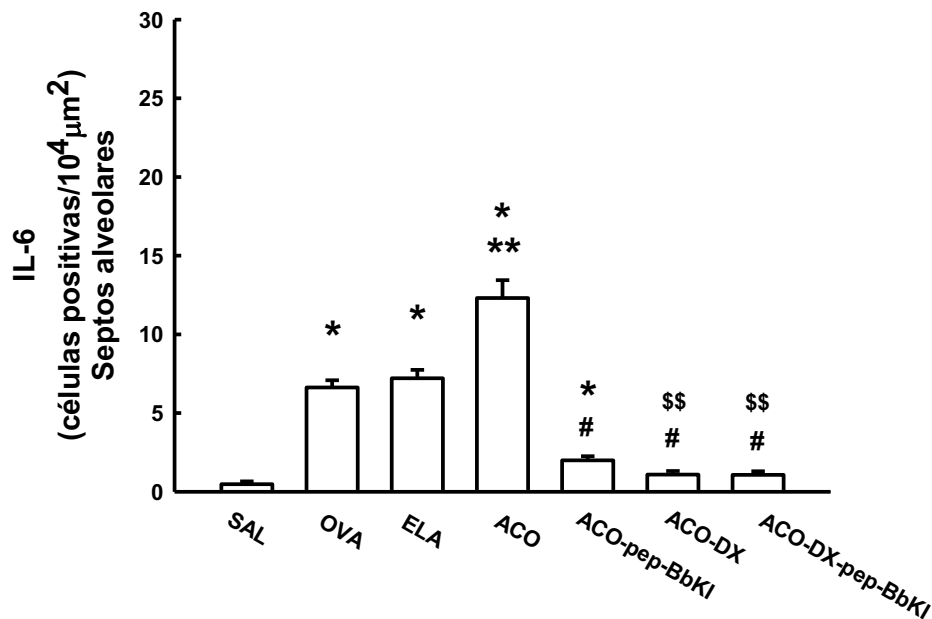


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO.

### 5.5.8. Avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares

A **figura 23** mostra a avaliação do número de células positivas para IL-6 nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células nos grupos OVA, ELA e ACO em relação ao grupo SAL ( $p < 0,05$  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). Os grupos tratados com corticosteroide, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI revertem totalmente as alterações de células positivas para IL-6 quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO-pep-BbKI atenuou estas alterações quando comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois este grupo foi diferente de SAL ( $p < 0,05$ ). Na comparação entre os grupos tratamento, ACO-pep-BbKI apresentou maior positividade para IL-6 quando comparado aos grupos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 23.** Número de células positivas para IL-6 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

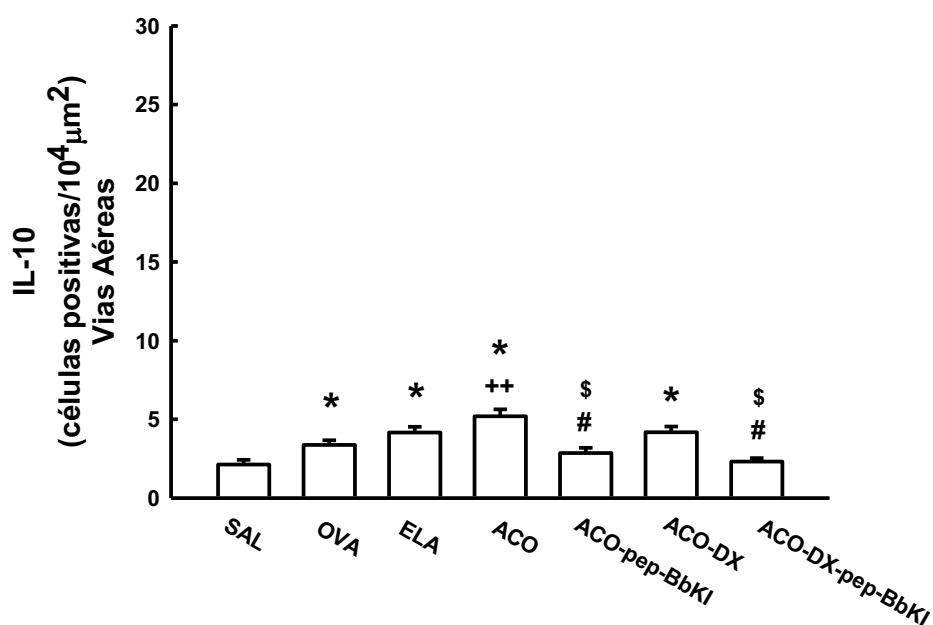


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

### 5.5.9 Avaliação do número de células positivas para IL-10 nas vias aéreas

A **Figura 24** demonstra a contagem de células positivas para IL-10 nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos um aumento da expressão destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo controle SAL ( $p < 0,05$  para todas comparações). O grupo ACO foi superior em células positivas para IL-10 quando comparado ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratados com inibidor de proteinase, ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI mostraram resposta com reversão total das alterações na contagem de células positivas para IL-10 quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), visto que foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ). O grupo ACO-DX não foi diferente de ACO ( $p > 0,05$ ), e foi diferente de SAL ( $p < 0,05$ ). Os grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI foram diferentes do grupo ACO-DX ( $p < 0,05$  para ambas as comparações) com menor contagem de células positivas para IL-10.

**Figura 24.** Número de células positivas para IL-10 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



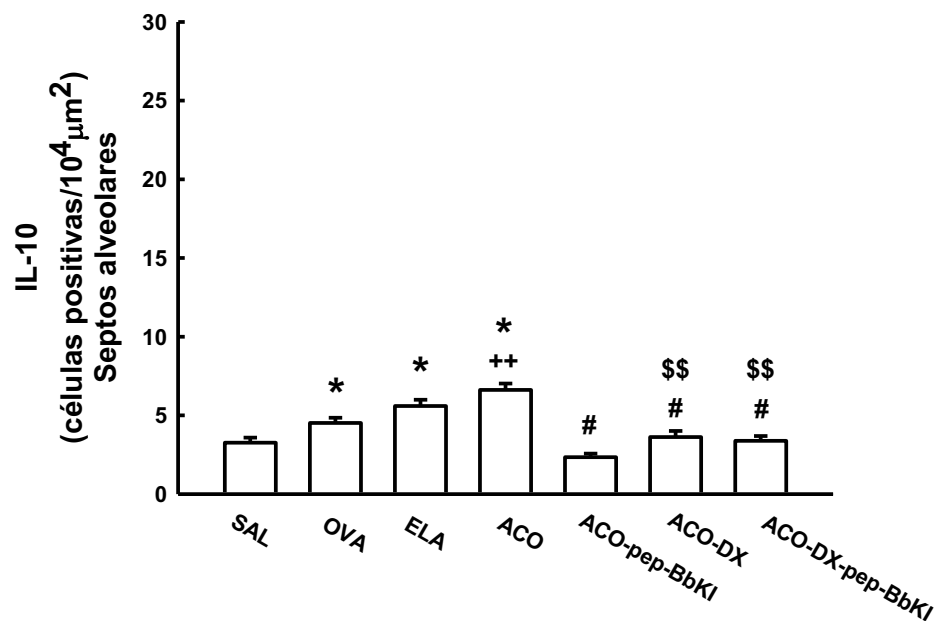
Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.



### 5.5.10 Avaliação do número de células positivas para IL-10 nos septos alveolares

A **Figura 25** demonstra a contagem de células positivas para IL-10 nos septos alveolares nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve um aumento da destas células positivas para IL-10 nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo controle SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO foi maior em células positivas para IL-10 quando comparado ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações na contagem de células positivas para IL-10 quando comparados aos grupos ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Entre os grupos tratamento, o grupo ACO-pep-BbKI mostrou maior diminuição em células positivas para IL-10 do que os grupos que continham corticosteroide no tratamento ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 25.** Número de células positivas para IL-10 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

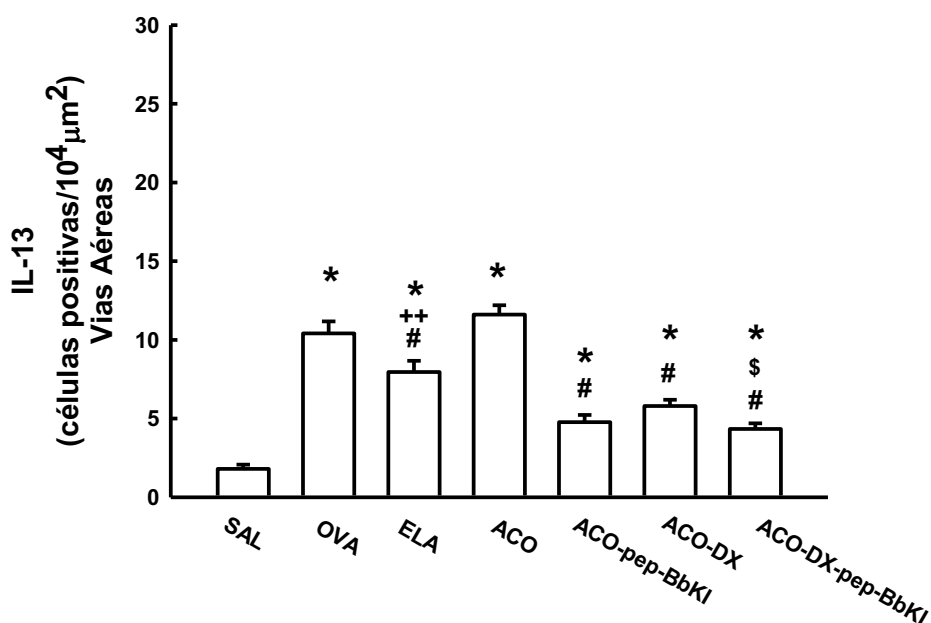


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

### 5.5.11 Avaliação do número de células positivas para IL-13 nas vias aéreas

A **Figura 26** demonstra a contagem de células positivas para IL-13 nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  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 tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações em número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), visto que foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo tratamento ACO-DX apresentou maior positividade para IL-13 do que o grupo tratado em associação do inibidor e corticosteroide ACO-DX-pep-BbKI ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26.** Número de células positivas para IL-13 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

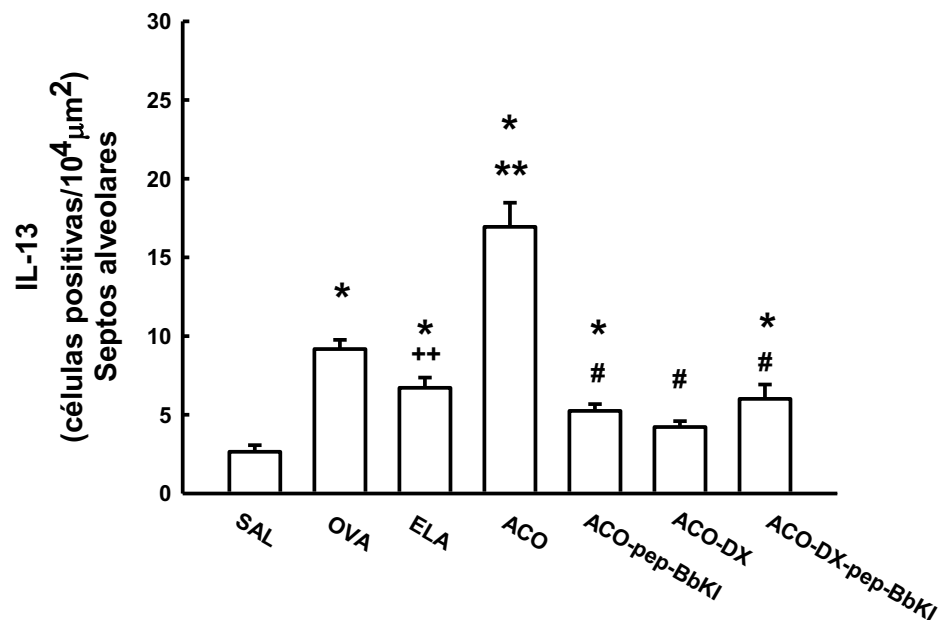


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.5.12 Avaliação do número de células positivas para IL-13 nos septos alveolares

A **Figura 27** demonstra a contagem de células positivas para IL-13 nos septos alveolares nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  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 tratamento ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações em número de células positivas para IL-13 quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois os dois grupos foram diferentes de SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo tratado com corticosteroide ACO-DX reverteu totalmente as alterações em comparação ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), visto que foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ).

**Figura 27.** Número de células positivas para IL-13 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

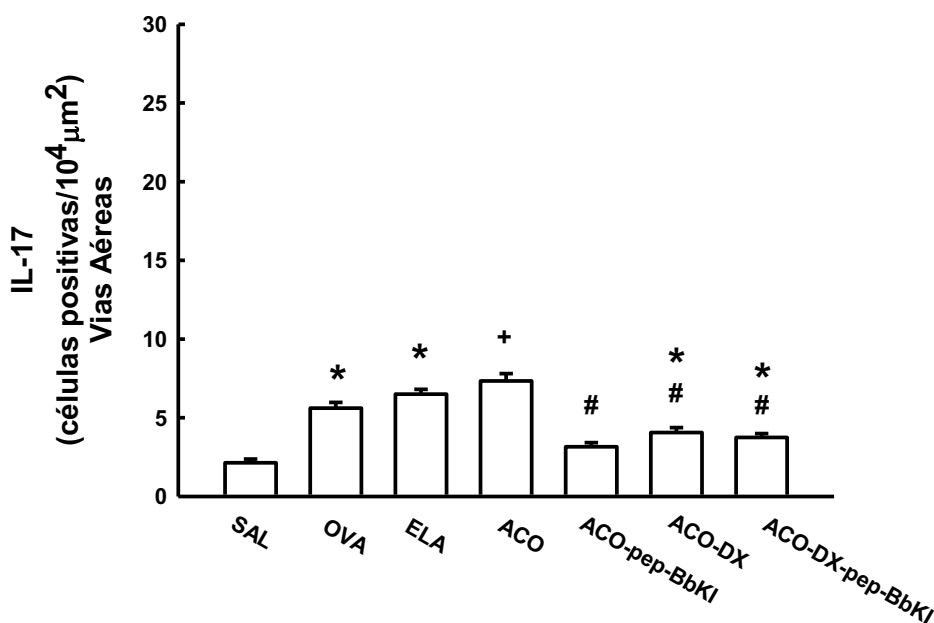


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.5.13 Avaliação do número de células positivas para IL-17 nas vias aéreas

A **Figura 28** demonstra a contagem de células positivas para IL-17 nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO 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 ( $p < 0,05$ ). O grupo tratado com peptídeo inibidor de proteinase ACO-pep-BbKI reverteu totalmente as alterações em número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ). Os grupos tratados com dexametasona ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), visto que foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 28.** Número de células positivas para IL-17 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

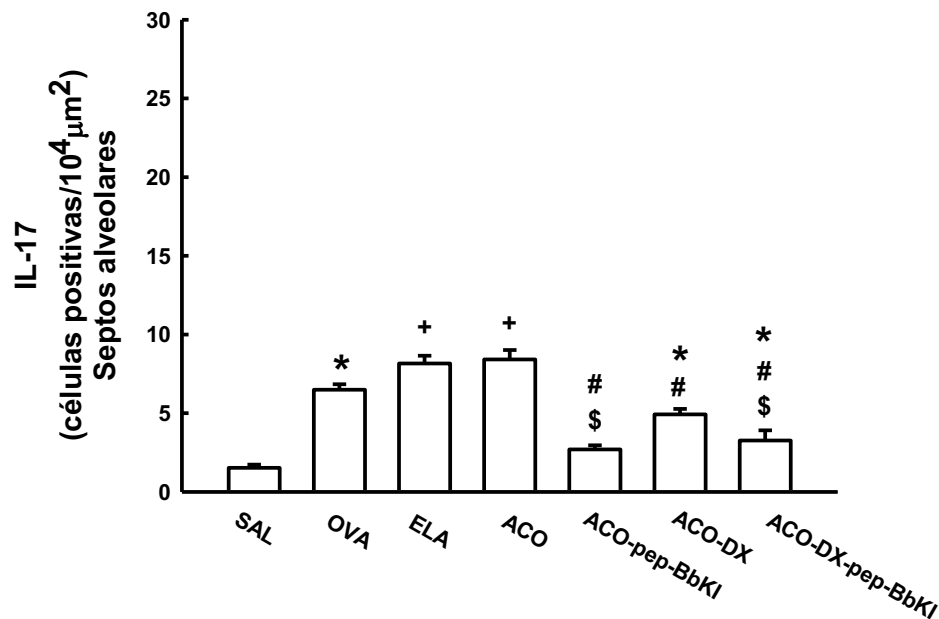


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; + $p < 0,05$  comparado aos grupos SAL e OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

#### 5.5.14 Avaliação do número de células positivas para IL-17 nos septos alveolares

A **Figura 29** demonstra a contagem de células positivas para IL-17 nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  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 reverteu totalmente as alterações em número de células positivas para IL-17 quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi semelhante ao SAL ( $p > 0,05$ ). Os grupos tratados com corticosteroide ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações em comparação ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratados com pep-BbKI tiveram maior diminuição de células positivas para IL-17 do que o grupo tratado com corticosteroide apenas (ACO-DX) ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 29.** Número de células positivas para IL-17 (células/ $10^4\mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

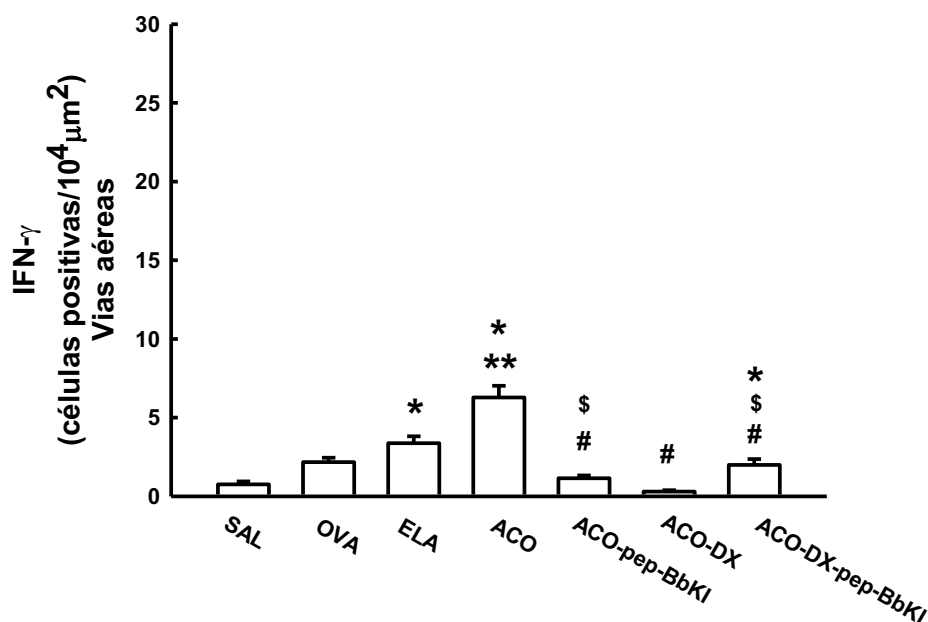


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; + $p < 0,05$  comparado aos grupos SAL e OVA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.5.15 Avaliação do número de células positivas para IFN- $\gamma$ nas vias aéreas

A **Figura 30** demonstra a contagem de células positivas para IFN- $\gamma$  nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Foi observado aumento destas células positivas nos grupos ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior expressão de IFN- $\gamma$  em relação aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI e ACO-DX reverteram totalmente as alterações em número de células positivas para IFN- $\gamma$  quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois estes dois grupos não foram diferentes de SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO-DX-pep-BbKI atenuou as alterações comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), visto que foi diferente do grupo SAL ( $p < 0,05$ ). Na comparação entre os grupos tratamentos, ACO-DX mostrou menor contagem de células positivas para IFN- $\gamma$  do que ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 30.** Número de células positivas para IFN- $\gamma$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

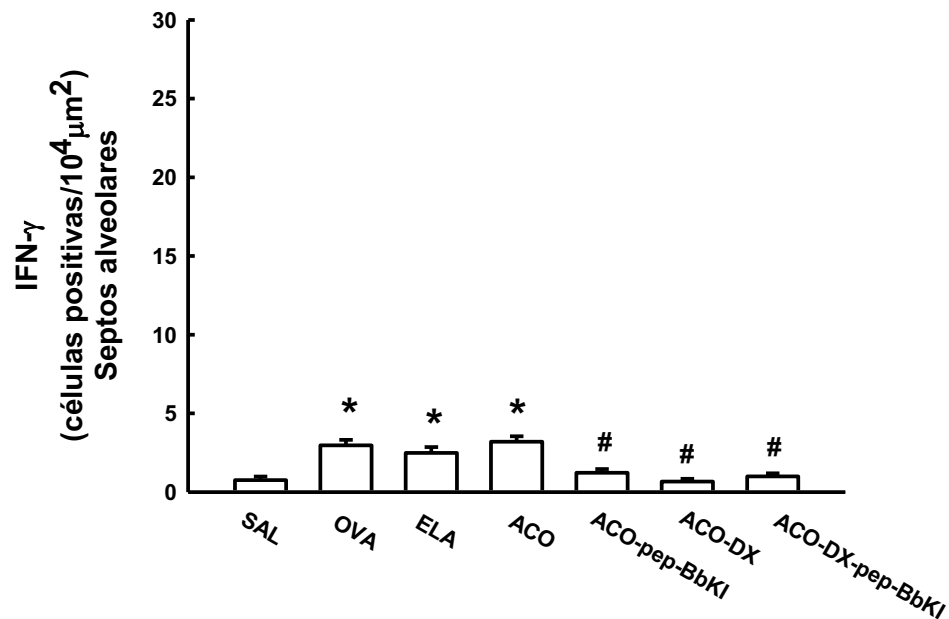


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.5.16 Avaliação do número de células positivas para IFN- $\gamma$ nos septos alveolares

A **Figura 31** demonstra a contagem de células positivas para IFN- $\gamma$  nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações em número de células positivas para IFN- $\gamma$  quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), visto que estes grupos foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 31.** Número de células positivas para IFN- $\gamma$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI;

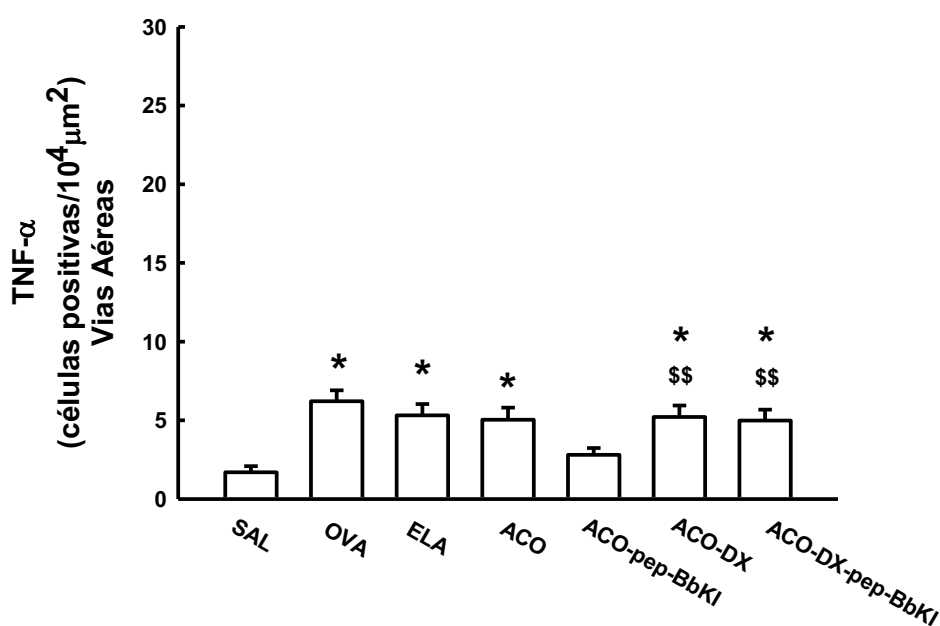


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO.

### 5.5.17 Avaliação do número de células positivas para TNF- $\alpha$ nas vias aéreas

A **figura 32** demonstra a contagem de células positivas para TNF- $\alpha$  nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos que os grupos OVA, ELA e ACO apresentaram maior número destes 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 tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI não foram diferentes do grupo ACO ( $p > 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO-pep-BbKI apresentou menor contagem de células positivas para TNF- $\alpha$  do que os grupo ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 32.** Número de células positivas para TNF- $\alpha$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



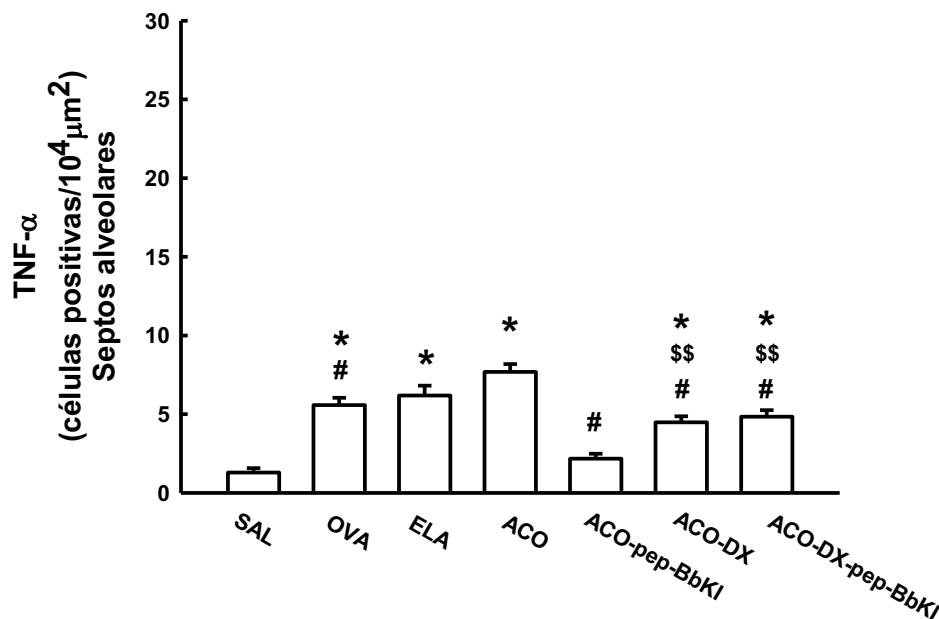
Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \$\$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.



### 5.5.18 Avaliação do número de células positivas para TNF- $\alpha$ nos septos alveolares

Na **figura 33** encontramos a contagem de células positivas para TNF- $\alpha$  nos septos alveolares nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO, quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO foi superior ao grupo OVA na expressão de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). Houve reversão total das alterações do número de células positivas para TNF- $\alpha$  no grupo tratamento ACO-pep-BbKI quando comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), visto que foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ). Os grupos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram estas alterações comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram diferentes de SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Entre os grupos tratamento, o grupo que recebeu apenas o inibidor de proteinase ACO-pep-BbKI mostrou maior diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  em relação aos grupos tratados com corticosteroide ACO-DX e ACO-DX-BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 33.** Número de células positivas para TNF- $\alpha$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



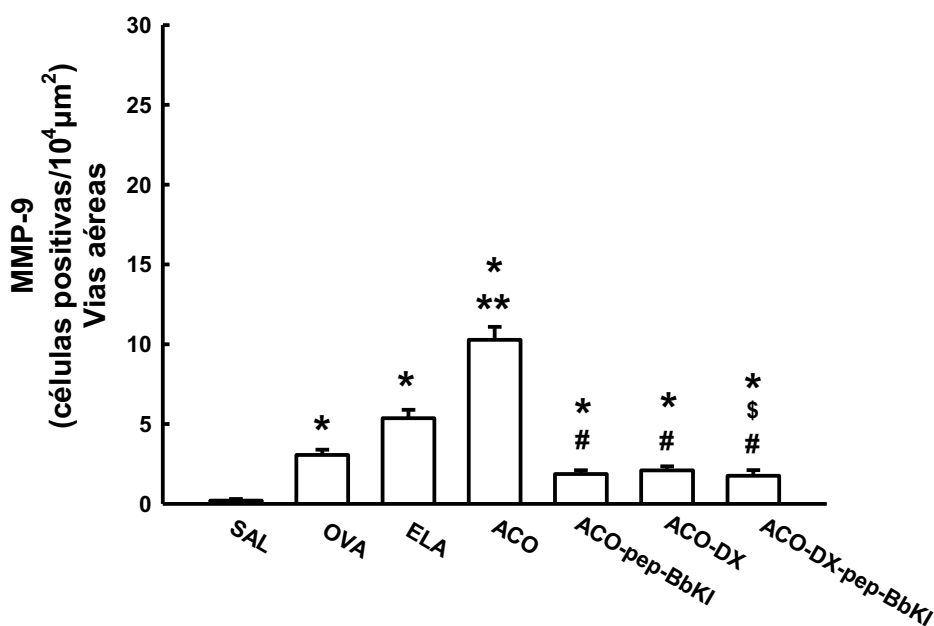
Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

## 5.6 Marcadores de Remodelamento de Matriz Extracelular

### 5.6.1 Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas

A **Figura 34** demonstra a contagem de células positivas para MMP-9 nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA, ACO, quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas comparações). 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 tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações no número de células positivas para MMP-9 quando comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), visto que estes grupos foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo tratado em associação de dexametasona e o peptídeo BbKI mostrou menor expressão de MMP-9 comparado ao grupo tratado apenas com o corticosteroide ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 34.** Número de células positivas para MMP-9 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

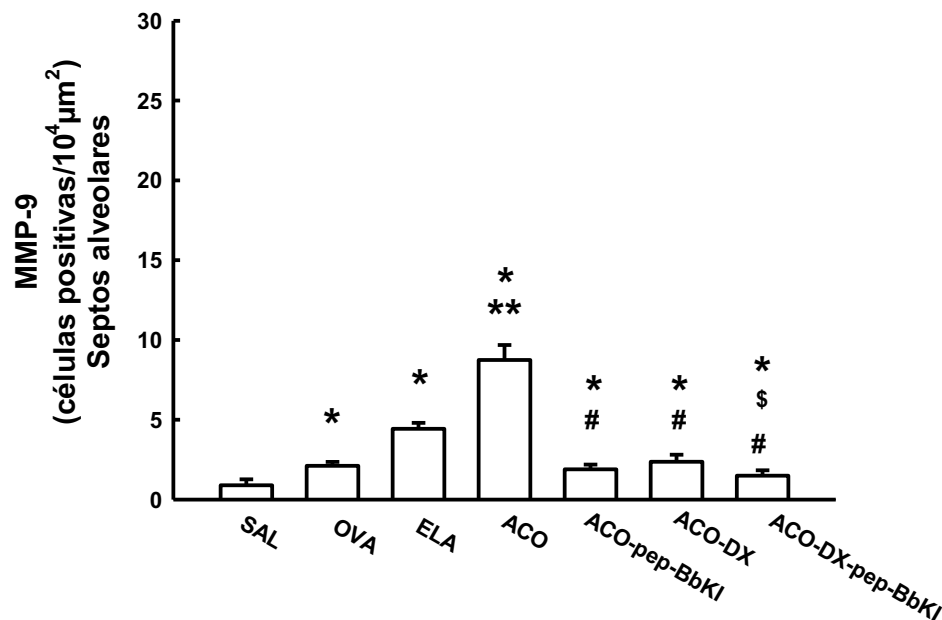


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.6.2 Avaliação do número de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares

A **Figura 35** demonstra a contagem de células positivas para MMP-9 nos septos alveolares nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). 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). Todos os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações no número de células positivas em comparação ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo tratado em associação de dexametasona e o peptídeo BbKI mostrou menor expressão de MMP-9 comparado ao grupo tratado apenas com o corticosteroide ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 35.** Número de células positivas para MMP-9 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

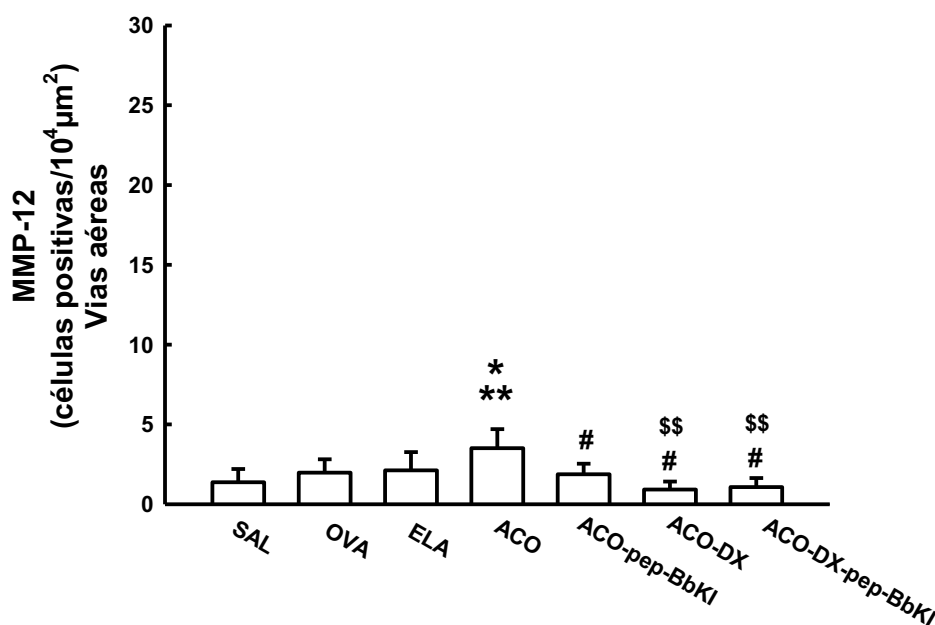


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  quando comparado aos grupos OVA e ELA; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.6.3 Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas

A **Figura 36** demonstra a contagem de células positivas para MMP-12 nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas no grupo ACO quando comparado ao grupo SAL ( $p < 0,05$ ). 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 tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações em número de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações). Na comparação entre os grupos tratamentos, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI mostraram menor contagem de células positivas para MMP-12 do que ACO-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 36.** Número de células positivas para MMP-12 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

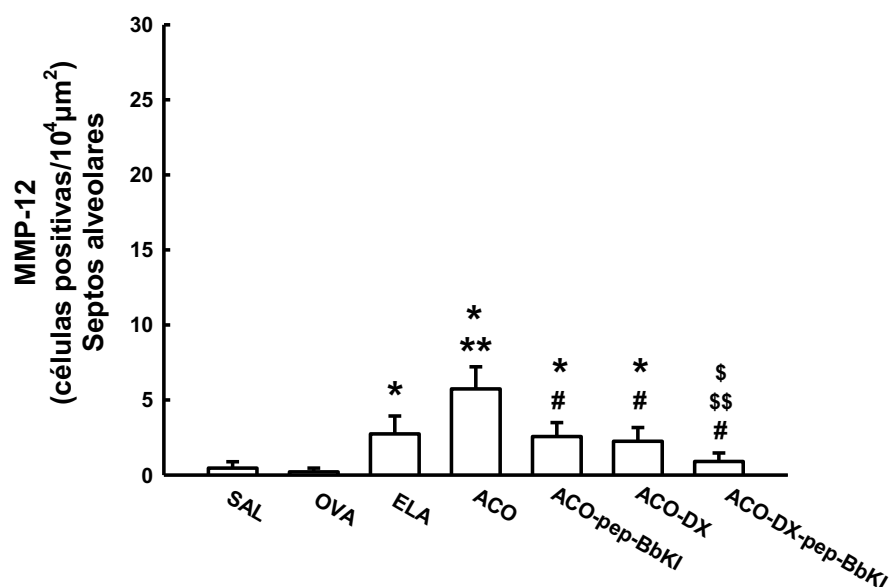


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; ## $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

#### 5.6.4 Avaliação do número de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares

A **Figura 37** demonstra a contagem de células positivas para MMP-12 nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células positivas nos grupos ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  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 tratamento ACO-pep-BbKI e ACO-DX atenuaram as alterações em número de células positivas para MMP-12 quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo tratado com corticosteroide e o peptídeo inibidor de proteinase (ACO-DX-pep-BbKI) reverteu totalmente as alterações de células positivas quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ). Assim como ACO-DX-pep-BbKI mostrou menor contagem em células positivas para MMP-12 do que os grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 37.** Número de células positivas para MMP-12 (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

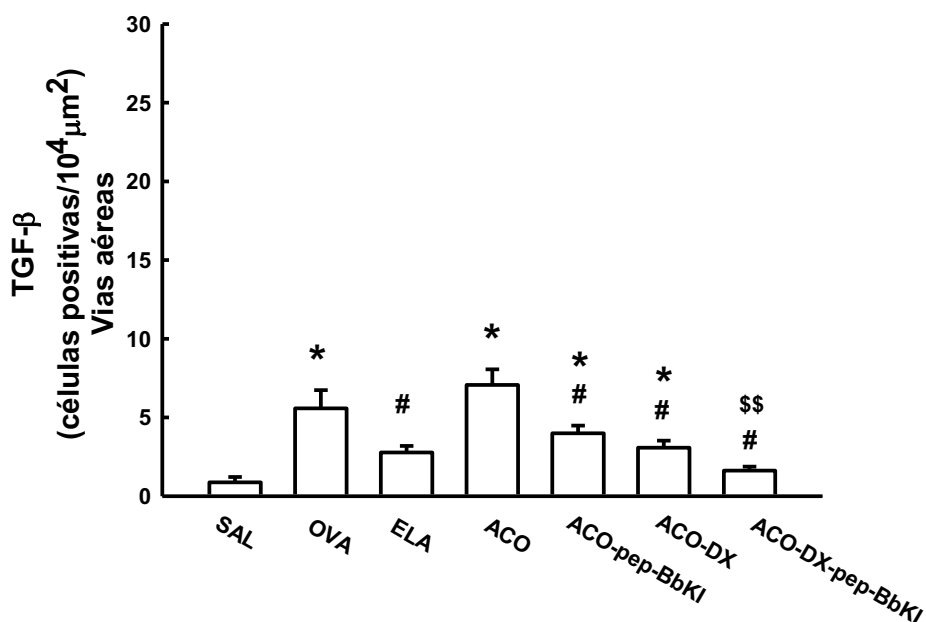


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-pep-BbKI; \$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.6.5 Avaliação do número de células positivas para TGF- $\beta$ nas vias aéreas

A **figura 38** mostra a avaliação do número de células positivas TGF- $\beta$  nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células nos grupos experimentais OVA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou maior contagem de células positivas para TGF- $\beta$  em comparação ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI e ACO-DX atenuaram as alterações com diminuição de TGF- $\beta$  comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), visto que estes grupos tratamento foram diferentes de SAL ( $p < 0,05$ ). O grupo ACO-DX-pep-BbKI reverteu totalmente as alterações comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ). ACO-DX-pep-BbKI mostrou menor positividade destas células em comparação ao grupo ACO-pep-BbKI ( $p < 0,05$ ).

**Figura 38.** Número de células positivas para TGF- $\beta$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI;

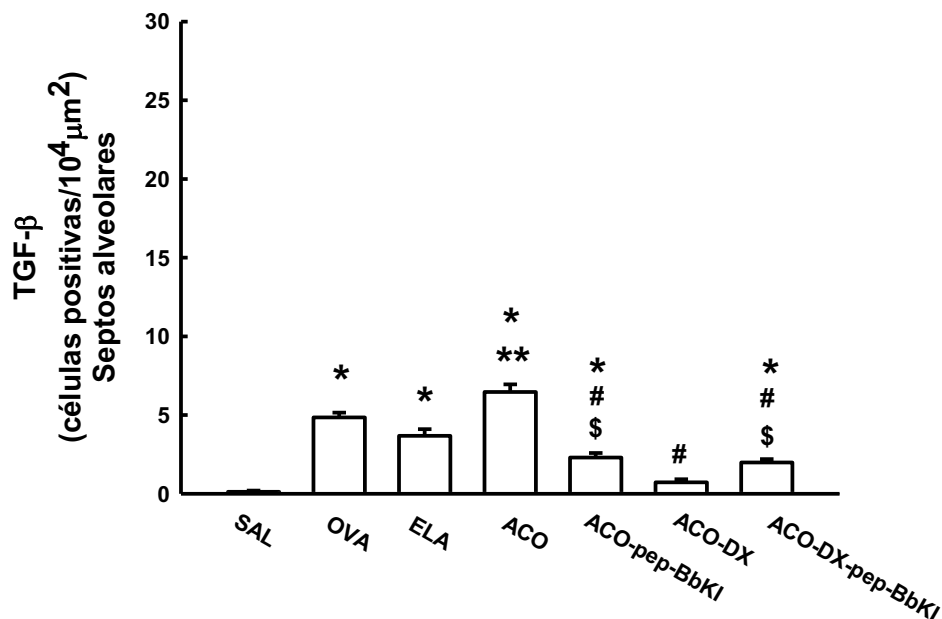


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

### 5.6.6 Avaliação do número de células positivas para TGF- $\beta$ nos septos alveolares

A **figura 39** mostra a avaliação do número de células positivas para TGF- $\beta$  nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células nos grupos experimentais OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO apresentou maior contagem de células positivas para TGF- $\beta$  em comparação aos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações na expressão de TGF- $\beta$  comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO-DX reverteu totalmente as alterações das células positivas para TGF- $\beta$  comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), visto que foi semelhante ao grupo SAL ( $p > 0,05$ ). Entre os grupos tratamento, o grupo ACO-DX mostrou menor contagem destas células em comparação ao grupo ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 39.** Número de células positivas para TGF- $\beta$  (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

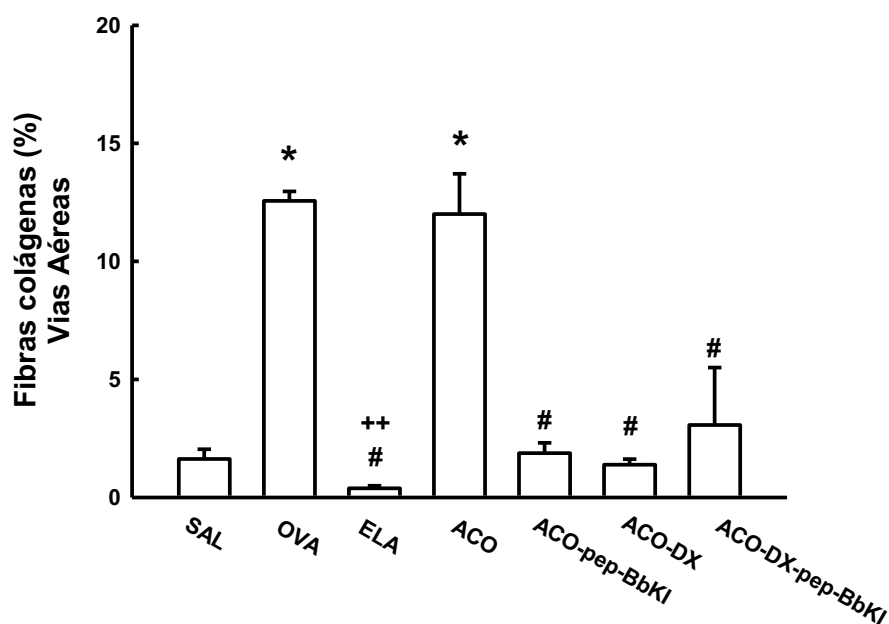


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-DX.

### 5.6.7 Avaliação da porcentagem de fibras colágenas nas vias aéreas

A **figura 40** mostra a avaliação das fibras colágenas nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento nos grupos OVA e ACO em relação ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO foi diferente do grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações de fibras colágenas comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), visto que os grupos tratados foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 40.** Valores em porcentagem de fibras colágenas (%) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



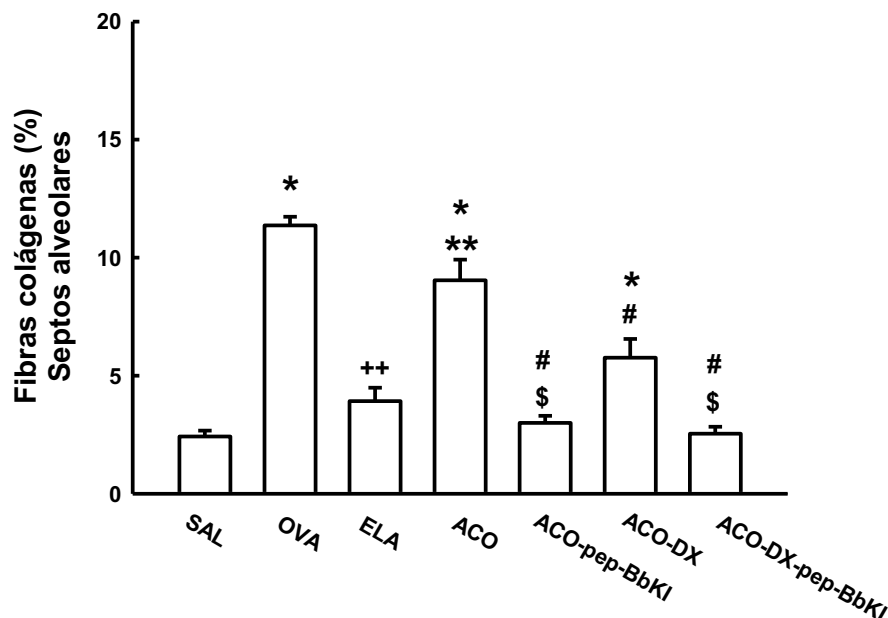
Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO.



### 5.6.8 Avaliação da porcentagem de fibras colágenas nos septos alveolares

A **figura 41** mostra a avaliação das fibras colágenas nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento do grupo OVA e ACO em relação ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO apresentou aumento da porcentagem de fibras colágenas comparado ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ), e foi menor comparado ao grupo OVA ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento que contêm o inibidor de protease como ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações de fibras colágenas comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), pois estes grupos tratados foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações). O grupo ACO-DX atenuou as alterações de fibras colágenas quando comparado ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), visto que foi diferente do grupo SAL ( $p < 0,05$ ). O grupo tratado com dexametasona apenas mostrou menor atenuação das alterações de fibras colágenas quando comparado aos grupos tratados que contêm o peptídeo BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 41.** Valores em porcentagem de fibras colágenas (%) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



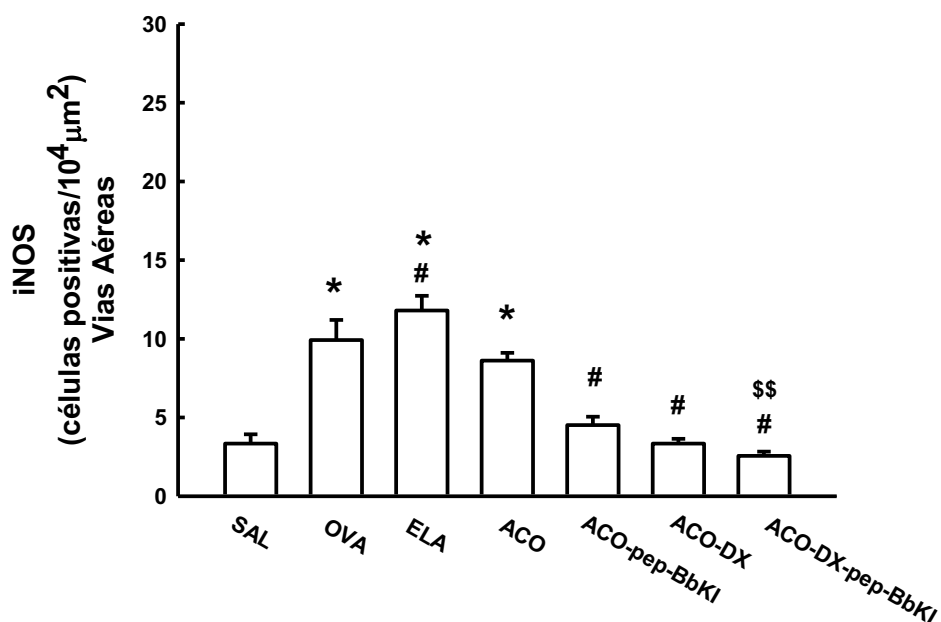
Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA e ELA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-DX.

## 5.7 Marcadores do Estresse Oxidativo

### 5.7.1 Avaliação do número de células positivas para iNOS nas vias aéreas

A **figura 42** demonstra a contagem de células positivas para iNOS nas vias aéreas nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento destas células positivas nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO apresentou menor positividade para iNOS quando comparado ao grupo ELA ( $p < 0,05$ ). Houve reversão total das alterações em número de células positivas para iNOS nos grupos tratados ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), pois foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações). A associação entre os tratamentos com corticosteroide e o inibidor de proteinase BbKI mostrou redução na positividade de iNOS em comparação ao grupo comparado ao tratamento com BbKI somente ( $p < 0,05$ ).

**Figura 42.** Número de células positivas para iNOS (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

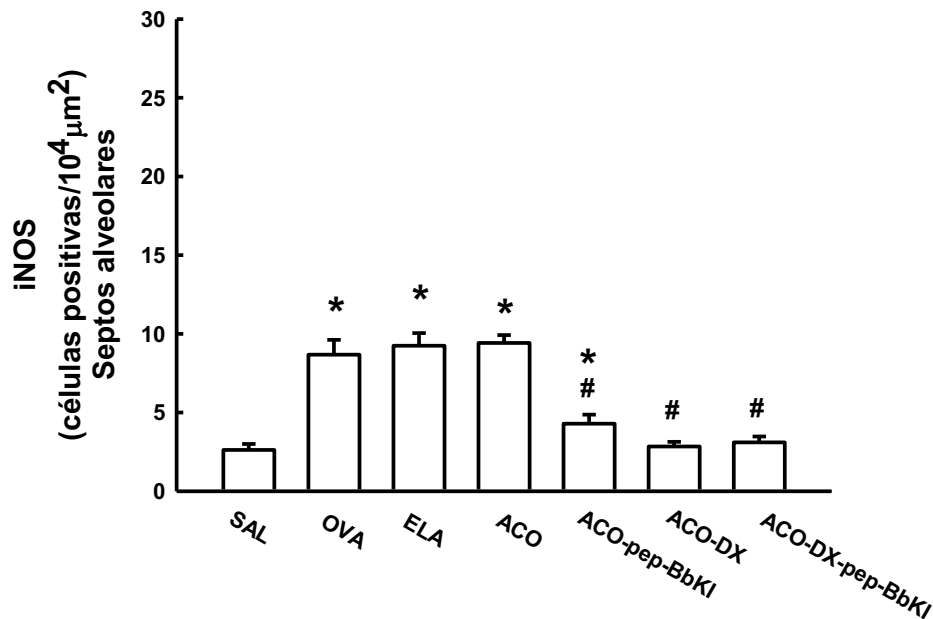


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

### 5.7.2 Avaliação do número de células positivas para iNOS nos septos alveolares

Na **figura 43** observamos a contagem de células positivas para iNOS nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI. Houve diferença no número destas células nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO-pep-BbKI atenuou as alterações no número de células positivas para iNOS em comparação ao grupo ACO ( $p < 0,05$ ), pois foi diferente do grupo SAL ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamento ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI reverteram totalmente as alterações destas células positivas para iNOS quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), visto que foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 43.** Número de células positivas para iNOS (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

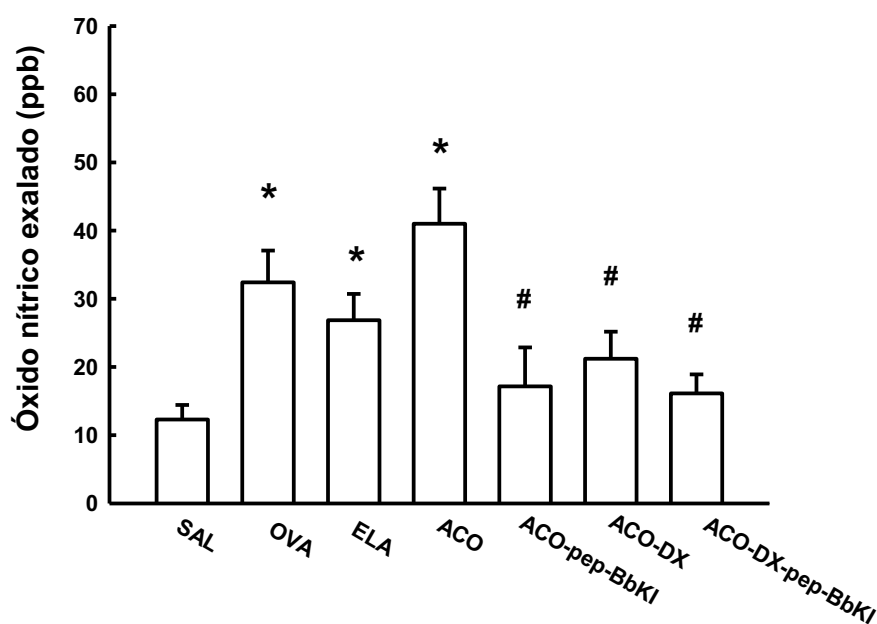


Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

### 5.7.3 Medida do Óxido Nítrico Exalado (NOex)

A **Figura 44** mostra a avaliação da medida de óxido nítrico exalado nos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Houve aumento do óxido nítrico exalado nos grupos OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Houve reversão total das alterações de NOex dos grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI quando comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), pois todos foram semelhantes ao grupo SAL ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

**Figura 44.** Valores de óxido nítrico exalado (ppb) dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.



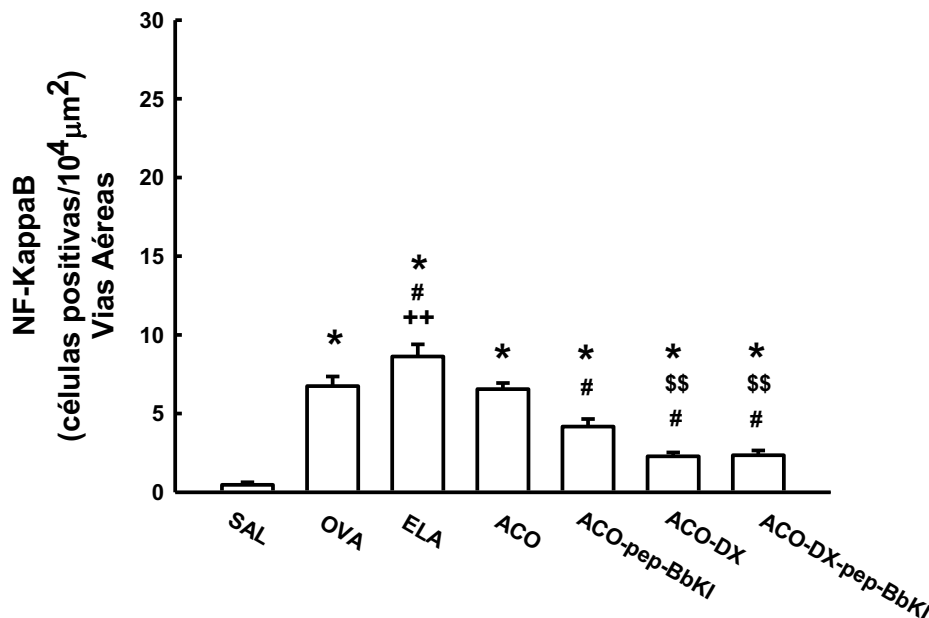
Nota: \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo SAL; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo ACO.

## 5.8 Fator de transcrição

### 5.8.1. Avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nas vias aéreas

A **figura 45** mostra a avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células nos grupos OVA, ELA e ACO em relação ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO foi diferente dos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações de células positivas para NF-kappaB comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para ambas as comparações), visto que todos foram diferentes do grupo SAL ( $p < 0,05$ ). Os grupos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI mostraram menor expressão de NF-KappaB comparado ao ACO-pep-BbKI ( $p < 0,05$  para ambas as comparações).

**Figura 45.** Número de células positivas para NF-KappaB (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nas vias aéreas dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

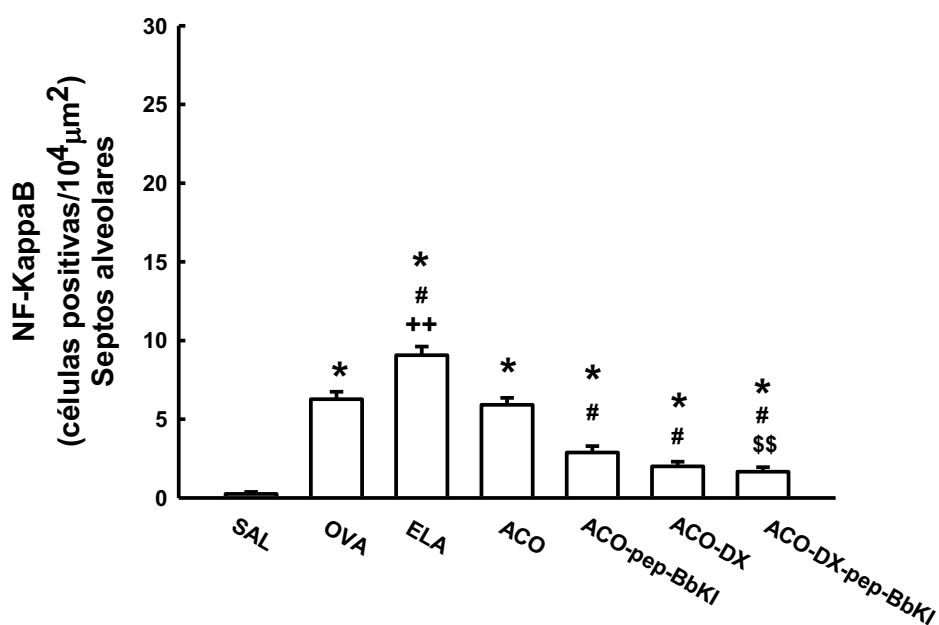


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

### 5.8.2 Avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nos septos alveolares

A **figura 46** mostra a avaliação do número de células positivas para NF-KappaB nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI. Observamos aumento destas células nos grupos experimentais OVA, ELA e ACO quando comparados ao grupo SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO foi diferente dos grupos OVA e ELA ( $p < 0,05$  para ambas as comparações). Os grupos tratamento ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI atenuaram as alterações de células positivas para NF-kappaB comparados ao grupo ACO ( $p < 0,05$  para todas as comparações), visto que todos foram diferentes de SAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações). O grupo ACO-DX-pep-BbKI mostrou menor expressão de NF-KappaB em comparação ao grupo ACO-pep-BbKI ( $p < 0,05$ ).

**Figura 46.** Número de células positivas para NF-KappaB (células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ) nos septos alveolares dos grupos SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX, ACO-DX-pep-BbKI.

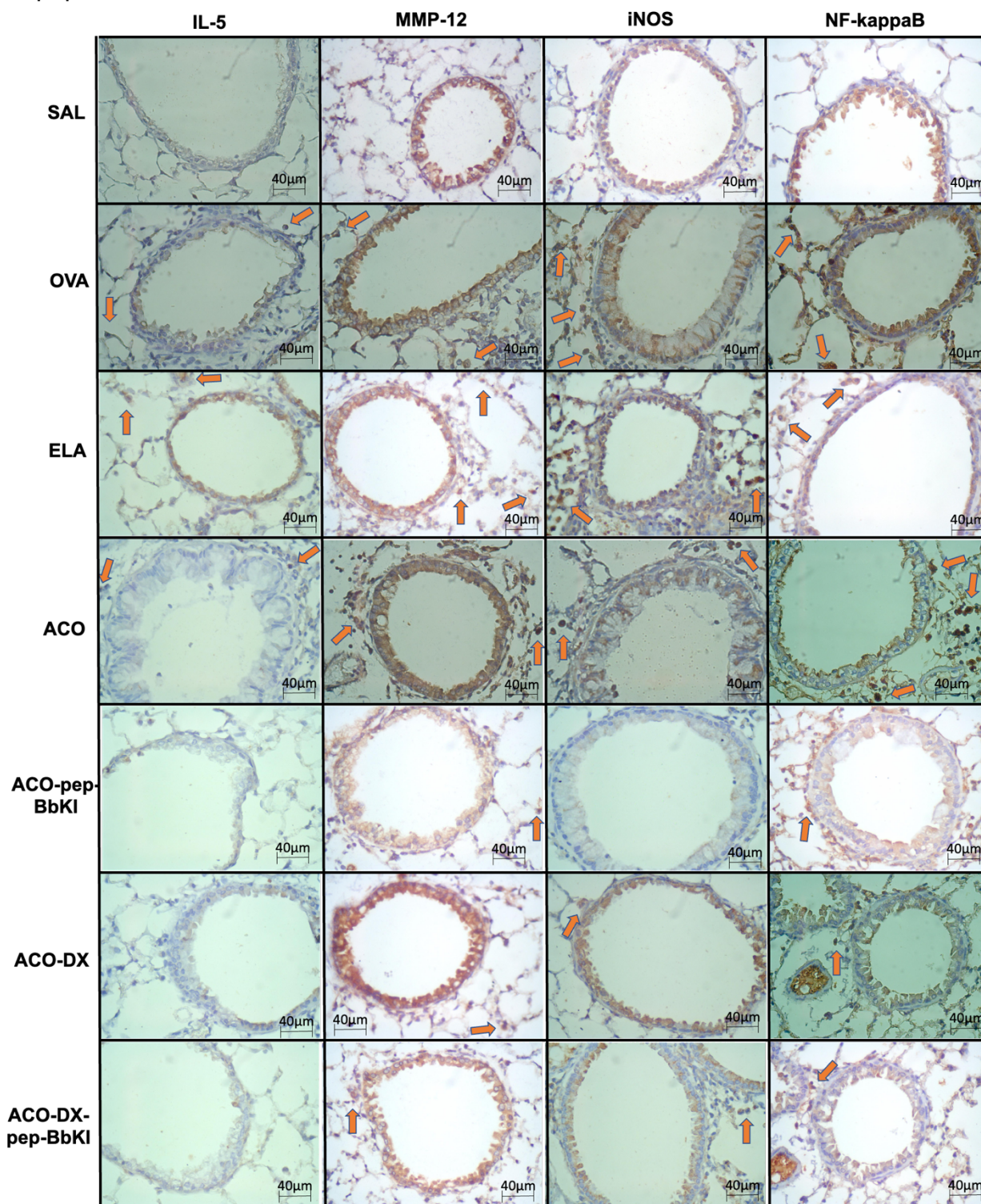


Nota: \* $p < 0,05$  comparado ao grupo SAL; ++ $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA; # $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO; \$\$ $p < 0,05$  comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.

## **5.9 Análise qualitativa**

As figuras 47 e 48 mostram imagens representativas dos marcadores inflamatórios, marcadores de remodelamento tecidual, estresse oxidativo e fator de transcrição, representadas por células positivas para IL-5, MMP-12, iNOS e NF-kappaB, nas vias aéreas (figura 47) e no parênquima pulmonar (figura 48).

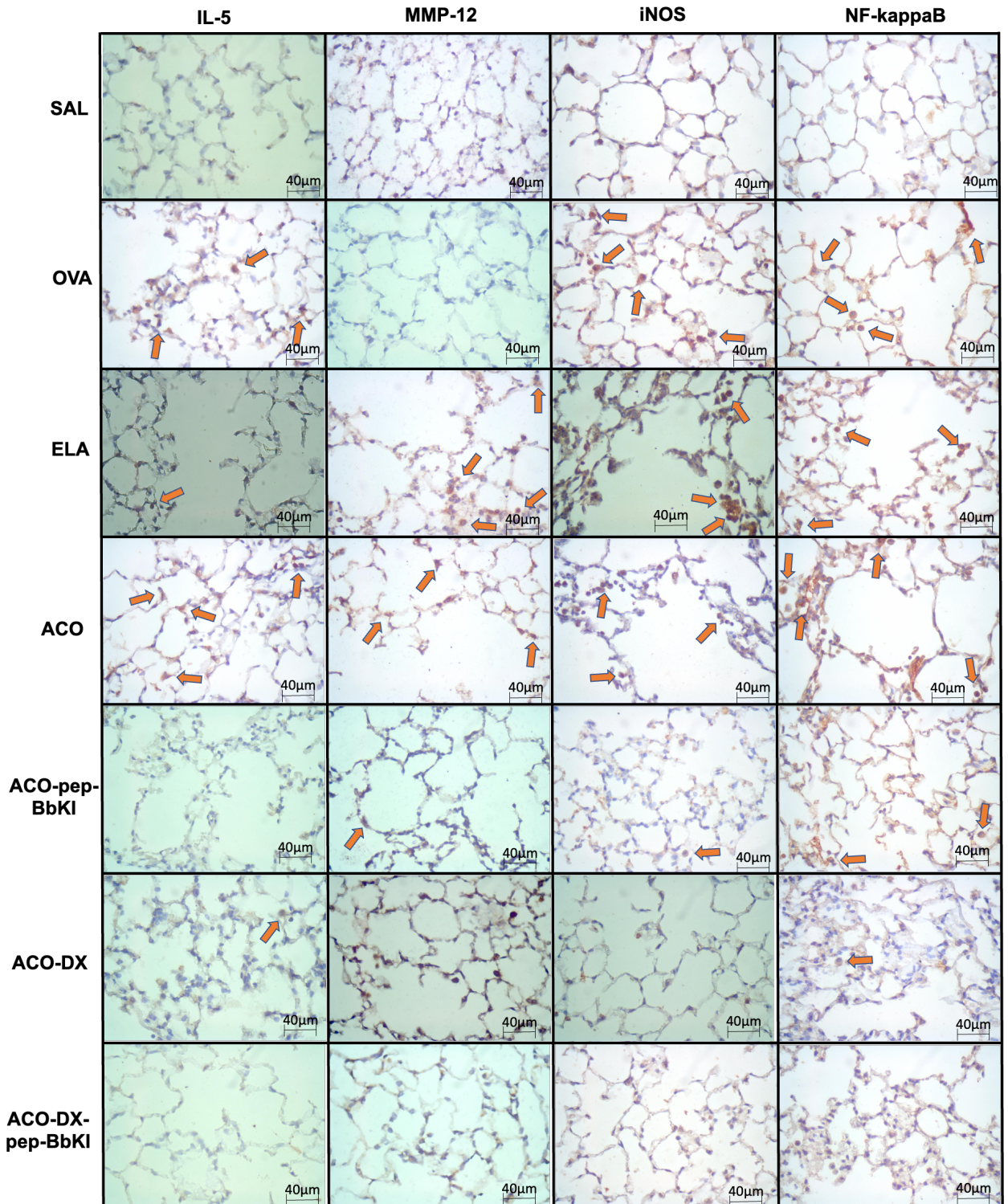
**Figura 47.** Análise qualitativa do marcador inflamatório (IL-5), marcador de remodelamento (MMP-12), estresse oxidativo (iNOS) e fator de transcrição (NF-kappaB). Fotos microscópicas dos resultados das análises imunohistoquímicas mostrando a presença de inflamação ao redor das vias aéreas. Ampliação de 400x. Os grupos experimentais são SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI.



Fonte: Produção do próprio autor, 2022.



**Figura 48.** Análise qualitativa dos 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. Ampliação de 400x. Os grupos experimentais são SAL, OVA, ELA, ACO, ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI.



Fonte: Produção do próprio autor, 2022.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos do peptídeo inibidor de protease *Bauhunia Bauhunioides* kallikrein inhibitor (BbKI) em um modelo experimental de sobreposição asma-DPOC. Esta sobreposição tem se tornado mais prevalente e os pacientes ainda não têm respondido favoravelmente às terapêuticas para ACO existentes. Até o presente momento, neste estudo, os animais sensibilizados e expostos ao protocolo descrito e tratados, com o inibidor BbKI e/ou dexametasona (ACO-pep-BbKI, ACO-DX-pep-BbKI e ACO-DX), apresentaram atenuação da hiperresponsividade à metacolina, nos parâmetros que foram avaliados relacionados à resposta inflamatória, estresse oxidativo, redução do remodelamento de matriz extracelular e de NF-kappaB, nas vias aéreas e dos septos alveolares. Além disso, os tratamentos estão se mostrando efetivos no controle da lesão do septo alveolar.

O uso de inibidores de proteinase foram associados ao controle inflamatório e oxidativo, e alguns estudos já mostraram melhorias em muitos aspectos da inflamação pulmonar, estresse oxidativo e remodelamento de matriz extracelular em modelos experimentais de enfisema induzido por elastase pancreática e modelo inflamatório alérgico pulmonar sensibilizado com ovalbumina (Almeida-Reis *et al.*, 2017, Bortolozzo *et al.*, 2018, Florencio *et al.* 2019, Martins-Oliveira *et al.*, 2016, Theodoro-Júnior *et al.*, 2017).

Modelos de enfisema ou asma em camundongos são mais comuns que modelos experimentais para a sobreposição asma-DPOC (ACO). Neste estudo, nosso modelo de ACO foi modificado de Ikeda *et al.* (2014). Nosso estudo mostrou aumento alveolar do tecido pulmonar, inflamação e remodelamento em camundongos sensibilizados com ovalbumina e enfisema induzido por elastase pancreática, constituindo em um interessante modelo de pesquisa para possíveis estratégias terapêuticas para sobreposição asma-DPOC.

Alguns de nossos dados são similares ao estudo de Ikeda *et al.* (2014), onde os autores usaram um modelo combinado de ovalbumina e elastase, sensibilizando camundongos com ovalbumina intraperitoneal e inalatória, mais instilação de elastase intratraqueal (OVA/OVA/PPE), e eles mostraram um aumento na hiperresponsividade das vias aéreas no desafio com metacolina e na complacência. No entanto, eles não avaliaram Raw, Htis e Gtis, utilizados para descrever as propriedades viscoelásticas dos sistema respiratório e resistência do tecido pulmonar.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com peptídeo BbKI tanto quanto a dexametasona reduziram a hiperresponsividade a metacolina avaliada pela resistência do sistema respiratório (Rrs), resistência das via aéreas (Raw) e resistência do tecido pulmonar (Gtis), mostrando a ação broncodilatadora do BbKI com diminuição da resistência do tecido sem diferença na comparação entre os tratamentos. Nós observamos também que o grupo tratamento ACO-pep-BbKI reverteu totalmente as alterações na elastância do sistema respiratório (Ers) observadas no grupo ACO e tornou-se similar ao grupo controle (SAL), sugerindo atenuação na destruição do parênquima e melhora no recolhimento elástico. Os demais tratamentos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI não foram diferentes de ACO, porém se igualaram ao grupo SAL.

Alguns estudos de enfisema induzido por elastase corroboram com nossos achados. Martins-Oliveira *et al.* (2016) encontraram redução na Raw e Rrs no tratamento com BbKI, assim como outros estudos utilizando inibidores de proteinase, como a *Crataeva tapia* Bark Lectin (CrataBL), *Bauhinia bauhinioides* cruzipain proteinase inhibitor (BbCI), e *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) que mostraram boa resposta na redução de Raw, porém nenhuma diferença na análise de Rrs e Gtis (Almeida-Reis *et al.*, 2017, Oliva *et al.*, 2015, Theodoro-Júnior *et al.*, 2017). Estudos em modelo experimental de asma também encontraram resultados similares aos nossos, utilizando tratamentos com inibidores de proteinase como CrataBL, EcTI e *Boophilus microplus* trypsin inhibitor (rBmTI-A), eles encontraram redução na Rrs e Ers (Bortolozzo *et al.*, 2018, Florencio *et al.* 2019, Rodrigues *et al.*, 2019).

Contudo, autores têm observado diferentes efeitos na mecânica pulmonar em modelos induzidos por elastase quando avaliadas a elastância do sistema respiratório (Ers) e elastância do tecido pulmonar (Htis). Estudos anteriores com animais que receberam elastase intratraqueal mostraram um aumento na Ers e Htis, e eles encontraram redução destes parâmetros após o tratamento com os inibidores de serino proteinase 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). É possível que uma explicação para esses diferentes resultados em nosso estudo, com redução de Ers e Htis nos grupos ELA e ACO, seja o tempo entre o dia de administração intratraqueal de elastase e o dia da mecânica pulmonar. Em nosso estudo este intervalo de tempo foi de 7 dias e os estudos citados anteriormente foram de 28 dias. O tempo para ocorrer o remodelamento tecidual em nosso estudo foi mais

curto, com maior lesão tecidual pela elastase, menos tempo para recrutamento de fibras colágenas e, portanto, uma diminuição na Ers e Htis para os grupos de emphysema e o grupo com sobreposição (ACO).

Ito *et al.* (2004 e 2005) estudaram camundongos que receberam elastase por nebulização e instilação direta, dois diferentes estudos, e eles observaram uma diminuição na elastância do sistema respiratório (Ers). Os autores reportaram que, depois do tratamento com elastase, a Ers diminuiu mesmo com um aumento de aproximadamente 50% no total de fibras colágenas no pulmão, implicando em uma anormalidade na função do colágeno. Eles ainda sugeriram que o remodelamento anormal do colágeno é o maior determinante da função pulmonar e forças mecânicas associadas com o enfisema.

A despeito destes diferentes resultados, Scuri *et al.* (2000) mostraram que a elastase causa um aumento na produção de bradicinina pela ativação de calicreína tecidual, causando broncoconstrição pelo aumento da resistência e elastância pulmonar. Estes autores mostraram que essa resposta não é revertida pelo tratamento com antagonista histamínico, mas foi efetivamente bloqueado por antagonistas do receptor de bradicinina B2, portanto sugerem participação do sistema calicreína-cinina no processo. Em nosso estudo, nós mostramos que o peptídeo BbKI melhora a função pulmonar, igualando a elastância do grupo ACO-pep-BbKI ao grupo controle (SAL). O BbKI, por sua vez, bloqueia a atividade de calicreína plasmática humana e em rato, tripsina, quimiotripsina e plasmina, e é o único inibidor isolado de plantas que inibe a atividade de calicreína tecidual (Brito *et al.*, 2014).

Em relação ao processo inflamatório avaliado pelo fluido do lavado broncoalveolar, nós encontramos um significativo declínio no número de células totais, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX em comparação ao grupo ACO, indicando um importante papel do inibidor de proteinase BbKI na atenuação do processo inflamatório. O grupo tratado dexametasona mostrou reversão total das alterações destas células inflamatórias citadas, pois igualou-se ao grupo controle (SAL). Contudo, as alterações de linfócitos foram revertidas pelo tratamento com dexametasona mas não com o tratamento com peptídeo BbKI somente. Na comparação entre os grupos tratados nós pudemos observar que a dexametasona teve uma melhor resposta na diminuição da contagem de eosinófilos comparado ao grupo tratado com BbKI, um importante efeito do corticosteroide na melhora da resposta inflamatória.

Estes resultados são similares ao reportado por Martins-Oliveira *et al.* (2016), em um modelo de enfisema, utilizaram tratamento com BbKI, e mostraram redução nas constagens de células totais, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no FLBA. Em contrapartida, eles encontraram diminuição no número de linfócitos, mas eles analisaram apenas o modelo de enfisema e nosso estudo avaliou a sobreposição de asma-DPOC. Outros estudos com inibidores de proteinase mostraram diminuição no número de células inflamatórias no LFBA. CrataBL (inibidor de preteínase que inibe tripsina) foi utilizada em um estudo com modelo de asma, os autores mostraram redução em células totais, macrófagos e linfócitos, outro estudo com o mesmo tratamento mas agora em modelo de enfisema, encontraram diminuição de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (Bortolozzo *et al.*, 2018, Oliva *et al.*, 2015). Almeida-Reis *et al.* (2017) mostraram redução no número de células totais e neutrófilos, utilizando como tratamento o BbCI (proveniente dos inibidores de plantas da família Kunitz) em um modelo de enfisema induzido por elastase. Este resultado é similar ao encontrado por Neuhof *et al.* (2003) em um modelo de edema pulmonar causado por ativação de neutrófilos, onde o BbCI inibidor de elastase diminuiu a formação de edema.

Florencio *et al.* (2019) e Lourenço *et al.* (2014) estudaram outro inibidor de serino proteinase, a *Boophilus microplus trypsin inhibitor* (rBmTI-A), o primeiro autor em um modelo experimental de asma observou a redução na concentração de eosinófilos, mas não houve redução de linfócitos. O segundo autor estudou este inibidor de proteinase em um modelo experimental de enfisema e eles encontraram redução na contagem de macrófagos, mas nenhuma redução para contagem de linfócitos também.

Nós encontramos uma diminuição importante do alargamento alveolar nos grupos tratamento em nosso estudo, os grupos ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI mostraram uma melhor atenuação do intercepto linear médio (Lm) do que o grupo tratado apenas com dexametasona. Esse resultado sugere que o tratamento com peptídeo BbKI diminuiu a lesão do parênquima. O Lm é a medida do espaço médio entre as paredes alveolares opostas, e o enfisema é caracterizado pela destruição da parede alveolar (GOLD, 2022). Muitos estudos com inibidores de proteinase corroboram com nossos achados, com a diminuição da medida do Lm posteriormente aos seus tratamentos (Almeida-Reis *et al.*, 2017, Martins-Oliveira *et al.*, 2016, Oliva *et al.*, 2015).

Em relação a avaliação dos marcadores inflamatórios, nas vias aéreas, nós observamos que o grupo ACO, comparado ao modelo de asma (grupo OVA), mostrou maior número de células positivas para IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$ , com exceção para IL-5 que apresentou maior número de células positivas no grupo OVA do que no grupo ACO. Na comparação com o modelo de enfisema (grupo ELA), o grupo ACO mostrou maior expressão de células positivas para IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IFN- $\gamma$ . Quando avaliado o parênquima pulmonar, o grupo ACO mostrou maior contagem de células positivas para IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 e TNF- $\alpha$  na comparação com o grupo OVA, e quando comparado ao grupo ELA, ACO apresentou maior expressão para IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Achados similares encontramos no estudo de Ikeda *et al.* (2014), eles mostraram que o grupo que foi sensibilizado com ovalbumina e recebeu elastase em associação apresentou um significativo aumento da hiperresponsividade das vias aéreas, nos níveis de leucotrieno, e células T CD4+ e CD8+ no LFBA, comparado aos animais do grupo asma sensibilizado com ovalbumina, ou o grupo de enfisema induzido por elastase separadamente. Estes resultados sugerem que os pulmões estavam mais inflamados no fenótipo do modelo de sobreposição asma-DPOC em comparação com os modelos de asma e enfisema.

Em nosso estudo, houve um aumento dos marcadores inflamatórios, como 1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  no modelo experimental de sobreposição asma-DPOC. Estas interleucinas e citocinas estão diretamente ligadas ao processo inflamatório na asma e DPOC como conhecido. Nós obtivemos uma boa resposta ao tratamento com o peptídeo inibidor BbKI, dexametasona, e a associação de ambos quando nós avaliamos todas as citocinas em comparação com o grupo ACO.

Observamos que nas vias aéreas a atenuação de células positivas para IL- $\beta$  e IFN- $\gamma$  foram maiores no grupo tratado com dexametasona quando comparado ao inibidor de proteinase BbKI sozinho, mas a análise no parênquima pulmonar, os tratamentos foram igualmente eficientes. Raundhal *et al.* (2015) sugerem que os altos níveis de IFN- $\gamma$  promovem hiperresponsividade das vias aéreas por meio da supressão da expressão do inibidor de proteinase secretora de leucócitos, nas células epiteliais dos brônquios e que a resposta imune mediada pelo IFN- $\gamma$  pode diferenciar a asma grave de leve a moderada, tanto em humanos como em camundongos. Corroborando com nossos resultados, nosso estudo mostrou redução de células

positivas para IFN- $\gamma$  e também mostrou diminuição da hiperresponsividade de vias aéreas, e ainda nós observamos que as células positivas para IFN- $\gamma$  foram maiores no grupo ACO do que no grupo OVA e ELA separadamente, nas vias aéreas. Estes achados também foram encontrados nos modelos animais de asma (Camargo *et al.*, 2018, Possa *et al.*, 2012, Rodrigues *et al.*, 2019). IL- $\beta$  tem sido recentemente discutido em casos de asma grave e relacionado a exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), mas os mecanismos ainda não estão claros. Mahmutovic Persson *et al.* (2018), em um modelo experimental de asma induzida por rinovírus, sugerem que as vias de sinalização de IL- $\beta$  podem estar causalmente envolvidas na indução de características neutrofílicas e de células Th2 de exacerbações de asma induzidas por vírus.

Em nosso estudo, a redução de células positivas para IL-5, nas vias aéreas, foi melhor em ambos os grupos tratados com inibidor (ACO-pep-BbKI e ACO-DX-pep-BbKI) quando comparados ao grupo tratado somente com corticosteroide, não houve diferença entre os grupos tratamento no parênquima pulmonar. A interleucina-5 tem um papel importante no recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas, e hoje, anticorpos monoclonais anti-IL-5 e anti-imunoglobulina E (IgE) já são utilizados no controle de exacerbação em asmáticos (Hamid; Tulic, 2009, Maselli *et al.*, 2019).

Todos os tratamentos foram igualmente eficientes nas vias aéreas, na redução de células positivas para IL-6, mas no parênquima os grupos tratados com dexametasona mostraram melhor resposta comparados ao tratamento somente com BbKI. Dos Santos *et al.* (2018) em seu modelo de asma mostraram aumento de células positivas para IL-6, e boa resposta no tratamento com anti-IL-17, inibidor de Rho-kinase, e na associação de ambos, nas vias aéreas e no parênquima pulmonar.

Células positivas para IL-10 e TNF- $\alpha$  apresentaram menor contagem no grupo tratado somente com o inibidor de proteinase BbKI comparado aos grupos tratados com dexametasona, nas vias aéreas e parênquima pulmonar. Há diversos mediadores inflamatórios na DPOC, e TNF- $\alpha$  é um deles, é produzido por macrófagos e/ou células epiteliais do sistema respiratório, e TNF- $\alpha$  é considerado um potente ativador de NF-kappaB, o que pode amplificar a resposta inflamatória. Na asma, citocinas Th2 mediam a inflamação alérgica, e citocinas como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  amplificam a resposta inflamatória e desempenham um papel maior na doença grave (Barnes, 2017, Parulekar *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, o tratamento com BbKI teve uma resposta similar em número de células positivas para IL-13 comparada ao grupo tratado com dexametasona, mas a associação entre os tratamentos (grupo ACO-DX-pep-BbKI) mostrou maior benefício na redução de células positivas nas vias aéreas, e no parênquima pulmonar os tratamentos foram similares entre eles. Interleucina-13 é um mediador da resposta alérgica em asmáticos, induz a hiperresponsividade dos brônquios, causa hiperplasia de células caliciformes e produção de mucina (Hamid; Tulic, 2009). Apesar de IL-13 ser uma citocina envolvida na asma, nós encontramos altos níveis também nos grupos ELA e ACO. Park *et al.* (2016) estudaram pacientes com DPOC, e encontraram altos níveis de eosinofilia e periostina (uma proteína envolvida na inflamação das vias aéreas), a qual é produzida a partir da indução de IL-13. Estes autores mostraram um aumento da VEF1 nestes pacientes quando tratados com corticosteroides em associação com beta agonistas de longa duração.

As células T-helper (Th)-17 têm sido implicadas nos processos de diversas doenças autoimunes e inflamatórias, alguns autores sugerem que IL-17 pode induzir IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ , além disso IL-17 aumenta a expressão de iNOS e está envolvida no recrutamento de macrófagos e neutrófilos (Ponce-Gallegos, 2017). Zijlstra *et al.* (2012) sugerem que IL-17 é uma das interleucinas responsáveis pela indução da resistência das células epiteliais dos brônquios aos efeitos dos esteróides. Nosso estudo mostrou diminuição da contagem de células positivas para IL-17, nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, com o tratamento com pep-BbKI e dexametasona, mas no septo alveolar nós encontramos melhor resposta nos grupos que continham o inibidor pep-BbKI como tratamento, do que no grupo tratado apenas com dexametasona. Alguns autores têm estudado tratamentos com anti-IL-17 em modelos experimentais com camundongos, de enfisema induzido por elastase e modelos de asma, e eles encontraram boa resposta com melhora na maioria dos parâmetros avaliados na inflamação e remodelamento (Camargo *et al.*, 2018, Dos Santos *et al.*, 2018, Fukuzaki *et al.*, 2021).

Há estudos de modelos experimentais em asma e enfisema separadamente com bons resultados no tratamento com inibidores de serino proteinases. Como rBmTI-A que mostrou reduções nas concentrações de células positivas para IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A e, CrataBL que reduziu números de células positivas para IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17, nas vias aéreas e parênquima pulmonar, ambos os estudos foram em



modelo de asma (Bortolozzo *et al.*, 2018, Florencio *et al.*, 2019). Serino proteinases em modelo de enfisema, como EcTI e BbKI, mostraram redução de TNF- $\alpha$  após o tratamento com estes inibidores (Martins-Oliveira *et al.*, 2016, Theodoro-Júnior *et al.*, 2017).

Em relação ao estresse oxidativo, nós mostramos redução de NO exalado, e uma diminuição nas células positivas para iNOS em todos os grupos tratados, nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, com o peptídeo inibidor BbKI e com a dexametasona (ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI), quando comparados ao grupo ACO. Resultados similares Martins-Oliveira *et al.* (2016) and Theodoro-Júnior *et al.* (2017) foram encontrados nestes estudos em modelo experimental de enfisema induzido por elastase, eles utilizaram BbKI e EcTI (como estrutura de proteína, não de peptídeo) respectivamente como tratamento, e mostraram atenuação da resposta do estresse oxidativo, com redução nos níveis de óxido nítrico exalado (NOex) e diminuição da expressão de células positivas para iNOS, nas vias aéreas e no septo alveolar.

Prado *et al.* (2005) em um modelo experimental de asma sensibilizado com ovalbumina mostraram um aumento nos níveis de NO exalado e de células positivas para iNOS. O óxido nítrico exalado é considerado um importante marcador de inflamação de via aérea na asma (Kharitonov *et al.*, 1996), pacientes asmáticos têm altos níveis de NOex, e quando são tratados com corticosteroides há um declínio nos seus níveis de NOex (Eynoot *et al.*, 2002). O papel dos inibidores de proteinase, em modelos experimentais de sobreposição asma-DPOC, precisa ser estudado para mais comparações, o que pode representar uma estratégia terapêutica promissora, uma vez que os corticosteroides têm muitos efeitos colaterais.

A respeito do remodelamento pulmonar, encontramos um aumento na expressão de células positivas para MMP-9, MMP-12 nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, e para TGF- $\beta$  somente no parênquima pulmonar, no grupo ACO comparado aos grupos OVA e ELA, sugerindo uma potencialização do remodelamento tecidual na sobreposição asma-DPOC em relação aos modelos de asma e enfisema separadamente. As fibras colágenas tiveram um aumento em porcentagem no modelo asma (OVA) e no modelo de sobreposição (ACO) comparados ao grupo controle (SAL), o modelo de enfisema (ELA) não mostrou aumento. Estes resultados provavelmente podem ser explicados porque os grupos OVA e ACO tiveram mais

tempo de sensibilização com ovalbumina e portanto mais tempo para o remodelamento, e o grupo ELA recebeu elastase 7 dias antes da mecânica, menos tempo para remodelamento de matrix extracelular. Lopes *et al.* (2013) estudaram diferenças entre dois modelos de enfisema, um grupo pelo modelo de elastase induzida onde os animais foram avaliados 28 dias após a instilação de EPP, e no outro grupo o modelo por exposição a fumaça de cigarro por um período de 6 meses. Eles encontraram em ambos os grupos um aumento de fibras colágenas tipo III, as quais foram maiores no grupo de animais expostos a fumaça de cigarro por 6 meses. Isso corrobora com estudos que mostraram que fibras colágenas aumentam com o passar do tempo a partir da indução do enfisema com elastase (Suki *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, a avaliação do remodelamento de matriz extracelular foi por meio da análise de células positivas para MMP-9, MMP-12, TGF- $\beta$  e porcentagem de fibras colágenas, nós observamos bons resultados com a atenuação destes marcadores em todos os grupos tratamento (ACO-pep-BbKI, ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI), comparados ao grupo ACO, nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. O tratamento associado do peptídeo inibidor de proteinase BbKI com dexametasona (ACO-DX-pep-BbKI) apresentou uma melhor atenuação da resposta de células positivas para MMP-9 comparado ao grupo tratado apenas com corticosteroide (ACO-DX), nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. Apesar da melhora com a diminuição da expressão de MMP-9, os grupos tratados ainda foram diferentes do grupo controle (SAL), sugerindo que houve atenuação, mas não reversão total das mudanças estruturais. As células positivas para MMP-12 e TGF- $\beta$  nos grupos tratados com corticosteroides tiveram melhor atenuação comparado ao grupo tratado apenas com o peptídeo BbKI, nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. As fibras colágenas tiveram diferença entre os tratamentos, somente na avaliação do parênquima, o tratamento com peptídeo BbKI associado ou não com dexametasona tiveram melhor atenuação das fibras colágenas comparado ao tratamento somente com corticosteroide.

Martins-Oliveira *et al.* (2016) mostraram resultados similares com redução de células positivas para MMP-9, MMP-12 e volume de fibras colágenas no grupo de enfisema tratado com o inibidor de proteinase BbKI (como proteína, não peptídeo). Assim como Almeida-Reis *et al.* (2017), mostraram resultados similares, mas utilizando outro inibidor de proteinase, o BbCI, em um modelo de elastase induzida.

Em um modelo experimental de asma, estudos com outro inibidor, Florencio *et al.* (2017) mostraram atenuação na expressão de MMP-9, TGF- $\beta$  e fibras colágenas com o tratamento de rBmTI-A, e Bortolozzo *et al.* (2018) utilizando tratamento com CrataBL reduziram células positivas para MMP-9, MMP-12 e volume de fibras colágenas, ambos os estudos comparados ao grupo sensibilizado com ovalbumina.

NF-kappaB é uma importante via de sinalização de inflamação em doenças pulmonares (Rico-Rosillo e Vega-Robledo, 2011) e tem sido considerado um importante regulador da resposta imune inata e adaptada. Estas ativações são associadas com inflamação, remodelamento e estresse oxidativo na doença pulmonar obstrutiva crônica, causada por uma variedade de sinais, como citocinas e patógenos (Possa *et al.* 2012; Aristoteles *et al.* 2013, Pantano *et al.* 2008). Neste estudo, nós encontramos atenuação de células positivas para NF-kappaB após o tratamento com o peptídeo BbKI e dexametasona comparados ao grupo ACO. Nas vias aéreas os grupos ACO-DX e ACO-DX-pep-BbKI mostraram uma melhor resposta na atenuação do que o grupo tratado somente com BbKI, e no parênquima pulmonar a associação do BbKI com a dexametasona mostrou melhor resposta do que o grupo ACO-pep-BbKI. Bortolozzo *et al.* (2018) obtiveram resultados similares em um estudo experimental utilizando CrataBL para tratar inflamação pulmonar alérgica crônica.

Nosso estudo teve algumas limitações, uma delas foi a falta de estudos avaliando o uso do inibidor de proteinase BbKI como tratamento em modelo experimental de sobreposição asma-DPOC em camundongos. Embora imunohistoquímica tenha sido utilizada para análises, outro método comparativo poderia ter sido utilizado para dar força aos nossos achados. Embora, em outros estudos nós previamente já tenhamos mostrado boa correlação de dados obtidos por imunohistoquímica e Elisa nos modelos de asma e enfisema. Mas nosso estudo apresenta grande fortaleza no grande número de marcadores que avaliamos no modelo experimental para melhorar o conhecimento sobre a sobreposição asma-DPOC. O processo inflamatório de doenças crônicas pulmonares, como asma e DPOC é complexo e torna-se um desafio devido a variedade de receptores e reações envolvidas. Além disso, nossos resultados trazem uma grande base para novos estudos e a possibilidade de explorar novas terapêuticas para o tratamento da sobreposição de asma-DPOC.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos que o modelo experimental de sobreposição asma-DPOC se mostrou efetivo, pois quando comparado ao grupo controle (SAL), os animais apresentaram exacerbação nos parâmetros da hiperresponsividade das vias aéreas nos desafios com metacolina, aumento de óxido nítrico exalado, piora na lesão alveolar observada pelo intercepto linear médio (Lm). Observamos também alterações na resposta inflamatória com aumento das células encontradas no lavado broncoalveolar (células totais, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos), também houve aumento das células positivas de todos os marcadores inflamatórios estudados, além da piora referente aos marcadores do remodelamento de matriz extracelular e de estresse oxidativo.

Observamos que o modelo experimental de ACO, em relação aos modelos de enfisema (grupo ELA) e de asma (grupo OVA), apresentou maior hiperresponsividade pulmonar no desafio à metacolina, com aumento da %Rrs e %Gtis, aumento do número de células totais do FLBA, piora do Lm, aumento das células positivas para IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13, IFN- $\gamma$ , MMP-9, MMP-12 e TGF- $\beta$ . Constatamos também diminuição da elastância do sistema respiratório do grupo ACO e ELA quando comparados ao grupo OVA.

O tratamento com o peptídeo inibidor de proteinase BbKI e o tratamento com dexametasona mostraram-se igualmente eficazes, apresentaram atenuação das respostas comparadas ao grupo ACO.

O grupo ACO-pep-BbKI reverteu totalmente as alterações sendo semelhante ao grupo SAL nos parâmetros que avaliaram a hiperresponsividade a metacolina (%Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis, %Htis), na diminuição de lesão de tecido avaliado pelo Lm e do estresse oxidativo representado pelo iNOS e NOex. Na resposta inflamatória reverteu o número de neutrófilos, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e na avaliação de remodelamento MMP-12 (VA) e fibras colágenas.

ACO-DX reverteu as alterações sendo semelhante ao grupo SAL na resposta de hiperresponsividade particularmente nos parâmetros da %Rrs, %Ers, %Raw, %Gtis e %Htis. Também houve reversão das alterações do Lm, nos marcadores inflamatórios: células totais e diferenciais do lavado broncoalveolar, IL-1 $\beta$ (septos alveolares), IL-5 (septos alveolares), IL-6 (septos alveolares), IL-10 (septos alveolares), IL-13 (septos alveolares), IFN- $\gamma$ . Também foi observada essa reversão na expressão celular de

MMP-12 (vias aéreas), TGF- $\beta$  (septos alveolares), fibras colágenas (vias aéreas) e dos marcadores de estresse oxidativo em relação às células positivas para iNOS e NO exalado.

O grupo ACO-DX-pep-BbKI potencializou a redução das alterações comparado a ACO-pep-BbKI e ACO-DX para MMP-12 (septos alveolares).

Portanto, observamos bons resultados com a utilização do peptídeo inibidor de proteinase BbKI. Contudo, mais estudos são necessários para fortalecer a possibilidade de se tornar uma futura estratégia terapêutica na sobreposição de asma-DPOC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

Akers IA, et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278 (1): L193-201. doi: <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.1.L193>

Almeida-Reis R, et al. Plant Proteinase Inhibitor BbCI Modulates Lung Inflammatory Responses and Mechanic and Remodeling Alterations Induced by Elastase in Mice. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 1-13. doi: 10.1155/2017/8287125.

Amălinei C, et al. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol*. 2010; 51 (2): 215-28. PMID: 20495735.

Araújo AP, et al. Kunitz-type Bauhinia bauhinioides inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. *Biol Chem*. 2005; 386 (6): 561-8. doi: 10.1515/BC.2005.066.

Aristoteles LR, et al. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. *BMC Pulm Med*. 2013 Aug; 52 (2013). doi:10.1186/1471-2466-13-52.

Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Resp J*. 2003; 22 (4): 672-88. doi: 10.1183/09031936.03.00040703.

Barnes PJ, Stockley R A. COPD: current therapeutic interventions and future approaches. *Eur Resp J*. 2005; 25: 1084-1106. doi: 10.1183/09031936.05.00139104.

Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clinical Science*. 2017Jun; 131(13):1541-1558. doi: 10.1042/CS20160487.

Barnes PJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers* 1. 2015 Dec; 15076. doi:10.1038/nrdp.2015.76.

Bates JH, Irvin CG. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. *J Appl Physiol*. 2003;94(4):1297–306. doi: 10.1152/jappphysiol.00706.2002.

Biselli PJC, et al. Analysis of respiratory mechanics in animal models: Its use in understanding lung behavior in emphysema and asthma. *Drug Discov Today: Dis Model*. 2019; 29-30:11-17. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.10.001>.

Bode W, Huber R. Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000 Mar; 1477(1-2):241-252. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00276-9<sup>1</sup>.

Bousquet J, et al. Asthma: from bronchoconstriction to airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May; 161(5):1720-1745. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9903102.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

Brannan JD. Bronchial Hyperresponsiveness in the assessment of asthma control. Airway Hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010; 138(2): 11S-17S. doi: 10.1378/chest.10-0231.

Brasil, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Morbidade Hospitalar do SUS, 2020 [Internet]. [Citado 20 jan. 2021]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990 Oct; 347(6295): 768-770. doi: 10.1038/347768a0.

Brito MV, et al. The Kallikrein Inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. *Thrombosis Research*. 2014 May; 133(5): 945-951. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.02.027>.

Camargo LN, et al. Effects of anti-IL-17 on inflammation, remodeling, and oxidative stress in an experimental model of asthma exacerbated by LPS. *Front Immunol*. 2018 Jan; 8:1835. doi: 10.3389/fimmu.2017.01835

Cataldo DD, et al. Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003 Sep; 49(6): 875–884. PMID: 14656045.

Churg A, Wright JL. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med*. 2005 Mar; 11(2):153-159. doi: 10.1097/01.mcp.0000149592.51761.e3.

Deshmukh HS, et al. Metalloproteinases mediate mucin 5AC expression by epidermal growth factor receptor activation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb; 171(4): 305-314. doi: 10.1164/rccm.200408-1003OC.

Eynott PR, et al. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol*. 2002 Sep; 452(1): 123-33. doi: 10.1016/s0014-2999(02)02237-9.

Florencio AC, et al. Effects of the serine protease inhibitor rBmTI-A in an experimental mouse model of chronic allergic pulmonary inflammation. *Sci Rep*. 2019 Sep; 9(1):12624. doi: 10.1038/s41598-019-48577-4. Erratum in: *Sci Rep*. 2019 Nov 13;9(1):17011. PMID: 31477763; PMCID: PMC6718655.

Friedman PJ. Imaging Studies In Emphysema. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 May; 5(4): 494-500. doi: 10.1513/pats.200708-128ET.

Fukunaga M, et al. Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1993 Jun; 264(6Pt 1): C1619-24. doi: 10.1152/ajpcell.1993.264.6.C1619.

Gafar F, et al. Predictors of clinical response to extrafine and non-extrafine particle inhaled corticosteroids in smoker and ex-smokers with asthma. *Respiratory Research*. 2018 Dec; 19(1): 256. doi: <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0961-2>.

Global Health Metrics. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017 Sep; 390(10100): 1211–59. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).

Global Initiative for Asthma (GINA) 2022. Global strategy for asthma management and Prevention Program. [Citado 28 may. 2022]. Disponível em: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2022/05/GINA-Main-Report-2022-FINAL-22-05-03-WMS.pdf>.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD (2022 Report). [Citado 20 may. 2022]. Disponível em: <https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2>.

Grainge CL, et al. Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med*. 2011 May; 364(21): 2006-2015. doi: 10.1056/NEJMoa1014350.

Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of Asthma. *Annual Review of Physiology*. 2009 Mar; 71 (1):489-507. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163200>.

Hendeles L, Asmus M, Chesrown S. Evaluation of cytokine modulators for asthma. *Paediatric Respiratory Review*. 2004; 5: S107-112. doi: 10.1016/s1526-0542(04)90020-6.

Holgate ST, et al. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am J Resp Crit Care Med*. 2000 Sep; 162(3 Pt 2): S113-7, 2000. doi: 10.1164/ajrccm.162.supplement\_2.ras-12.

Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine*. 2012 May; 18(5): 673-683. doi: 10.1038/nm.2731.

Ikeda G, et al. Effect of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on experimental emphysema and asthma combined with emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Jan; 50(Iss 1):18-29. doi: 10.1165/rcmb.2012-0418OC.

James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodeling in airway diseases. *Eur Respir J*. 2007; 30: 134-155. doi: 10.1183/09031936.00146905.

Johnson SR, Knox AJ. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends In Pharmacological Sciences*. 1997 Aug; 18(8): 288-292. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147\(97\)01092-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-6147(97)01092-4).

King PT. Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in a cardiovascular disease and lung cancer. *Clin Trans Med*. 2015; 4: 26. doi: 10.1186/s40169-015-0068-z.



- Koks CA, Groothuis PG, Slaats P. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in antegradely shed menstruum and peritoneal fluid. *Fertil Steril*. 2000 Mar; 73(3): 604-612. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00566-x.
- Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2004 Dec; 16(6): 702-8. doi: 10.1016/j.coi.2004.09.010.
- Lamas S, et al. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci*. 1992 Jul; 89(14):6348-6352. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.14.6348>.
- Lazaar L, Panettieri Jr RA. Is airway remodeling clinically relevant in asthma?. *Am J Med*. 2003 Dec; 115(8): 652-659. doi: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.07.010>.
- Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Sep; 164(5): 896-904. doi: 10.1164/ajrccm.164.5.2103040.
- Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb; 125(2 Suppl 2): 95-102. doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.047.
- Ling MF, Luster AD. Allergen-Specific CD4(+) T Cells in Human Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Mar;13 (suppl1):S25-30. doi 10.1513/AnnalsATS.201507-431MG.
- Lopes FD, et al. A comparative study of extracellular matrix remodeling in two murine models of emphysema. *Histol Histopathol*. 2013 Feb; 28(2): 269-76. doi: 10.14670/HH-28.269.
- Lourenço JD, et al. A Treatment with a Protease Inhibitor Recombinant from the Cattle Tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) Ameliorates Emphysema in Mice. *PLoS One*. 2014 Jun;9(6): e98216. doi: 10.1371/journal.pone.0098216.
- Maselli DJ, et al. Clinical Approach to the Therapy of Asthma-COPD Overlap. *Chest*. 2019 Jan; 155(1): 168-177. doi: 10.1016/j.chest.2018.07.028.
- MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2(4): 258-266. doi: 10.1513/pats.200504-045SR.
- Margraf L. et al. Morphometric Analysis of the Lung in Bronchopulmonary Dysplasia. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Feb; 143(2): 391-400. doi: 10.1164/ajrccm/143.2.391.
- Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*. 2011 Nov; 12(11): 233. doi: 10.1186/gb-2011-12-11-233.

Neuhof C, et al. Effect of Plant Kunitz Inhibitors from *Bauhinia bauhinioides* and *Bauhinia rufa* on Pulmonary Edema Caused by Activated Neutrophils. *Biol Chem*. 2003 Jun; 384(6): 939–944. doi: 10.1515/BC.2003.105.

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

Oliva LV, et al. A plant proteinase inhibitor from *Crataeva tapia* (CrataBL) attenuates elastase-induced pulmonary inflammatory, remodeling, and mechanical alterations in mice. *Process Biochemistry*. 2015; 50: 1958-1965. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.06.004>

Oliva ML, et al. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. *Immunopharmacology*. 1999 Dec; 45(1-3):163-169. doi: 10.1016/s0162-3109(99)00075-2.

Oliva ML, et al. *Bauhinia bauhinioides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. *Curr Med Chem*. 2001 Jul; 8(8):977-84. doi: 10.2174/0929867013372779.

Oliva ML, Sampaio MU. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. *An Acad Bras Ciênc*. 2009 Sep; 81(3): 615-621. doi: 10.1590/s0001-37652009000300023. Erratum in: *An Acad Bras Ciênc*. 2010 Jun;82(2):405.

Martins-Oliveira BT, et al. The Plant-Derived *Bauhinia bauhinioides* Kallikrein Proteinase Inhibitor (rBbKI) Attenuates Elastase-Induced Emphysema in Mice. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: 5346574. doi: 10.1155/2016/5346574.

Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leucocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999 Feb; 65(2): 137-50. doi: 10.1002/jlb.65.2.137.

Park HY, et al. Association of blood eosinophils and plasma periostin with FEV1 response after 3-month inhaled corticosteroid and long-acting beta2-agonist treatment in stable COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Dec; 11(1): 23-30, 2016. doi: 10.2147/COPD.S94797.

Pavord ID, et al. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. *Lancet*. 1999 Jun; 353(9171): 2213-14. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01813-9.

Possa SS, et al. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 Dec; 303(11): L939-952. doi: 10.1152/ajplung.00034.2012.

Pouwels SD, et al. Cigarette smoke-induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Feb; 310(4): L377-86. doi: 10.1152/ajplung.00174.2015.

- Prado CM, et al. Neurokinins and inflammatory cell INOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Apr; 288(4): L741-8. doi: 10.1152/ajplung.00208.2004.
- Putcha N, Wise RA. Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Syndrome: Nothing New Under the Sun. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016 Aug;36(3):515-28. doi: 10.1016/j.iac.2016.03.003.
- Reddel HK, et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jul 1;180(1):59-99. doi: 10.1164/rccm.200801-060ST.
- Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001 Aug;54(8):577-89. doi: 10.1136/jcp.54.8.577.
- Ricciardolo FL. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*. 2003 Feb; 58(2):175-82. doi: 10.1136/thorax.58.2.175.
- Richardson N. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods Plant Biochem*. 1991; 5:259-305.
- Rodrigues APD, et al. A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in a mouse model of asthma. *Histol Histopathol*. 2019 May; 34(5):537-552. doi: 10.14670/HH-18-059.
- Shapiro SD. Neutrophil elastase: path clearer, pathogen killer, or just pathologic? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Mar; 26(3):266-8. doi: 10.1165/ajrcmb.26.3.f233.
- Shapiro SD, et al. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2003 Dec; 163(6):2329-35. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63589-4.
- Sin DD, et al. What is asthma-COPD overlap syndrome? Towards a consensus definition from a round table discussion. *Eur Respir J*. 2016 Sep; 48(3):664-73. doi: 10.1183/13993003.00436-2016.
- Silva, HC. Purificação e caracterização parcial de uma lectina pró-inflamatória de sementes de *Bauhinia bauhinioides* MART. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Fortaleza, 2010.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb; 125(2 Suppl 2):S73-80. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.017.

Suki B, Lutchen KR, Ingenito EP. On the progressive nature of emphysema: roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Sep 1; 168(5):516-21. doi: 10.1164/rccm.200208-908PP.

Suki B, Bates JH. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Nov 30;163(1-3):33-43. doi: 10.1016/j.resp.2008.03.015.

Taguchi L, et al. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- $\kappa$ B, oxidative stress and metalloproteinases. *Respir Res*. 2015 Jun; 16(1):79. doi: 10.1186/s12931-015-0233-3. Erratum in: *Respir Res*. 2015;16:113.

Takahashi S, et al. Reversal of elastase-induced pulmonary emphysema and promotion of alveolar epithelial cell proliferation by simvastatin in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 May; 294(5):L882-90. doi: 10.1152/ajplung.00238.2007.

Tarantino, AB. *Doenças Pulmonares*. 4<sup>a</sup>. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Theodoro-Júnior OA, et al. A Plant Proteinase Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* Attenuates Pulmonary Mechanics, Inflammation and Remodeling Induced by Elastase in Mice. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 14;18(2):403. doi: 10.3390/ijms18020403.

Toledo AC, et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Br J Pharmacol*. 2013 Apr; 168(7):1736-49. doi: 10.1111/bph.12062.

Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Sep;5(9):785-99. doi: 10.1038/nrd2092.

Viegi G, et al. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J*. 2007 Nov; 30(5):993-1013. doi: 10.1183/09031936.00082507.

Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jun; 105(6 Pt 1):1041-53. doi: 10.1067/mai.2000.107195. PMID: 10856134.

Weibel ER. The challenge of measuring lung structure. On the "Standards for the Quantitative Assessment of Lung Structure". *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2010 Sep; 48(9):637-43. PMID: 20949741.

Wu W, et al. Multiview Cluster Analysis Identifies Variable Corticosteroid Response Phenotypes in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Jun;199(11):1358-1367. doi: 10.1164/rccm.201808-1543OC. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Aug 1;200(3):400.

Yousef GM, et al. Kallikrein gene downregulation in breast cancer. *Br J Cancer*. 2004 Jan; 90(1):167-72. doi: 10.1038/sj.bjc.6601451.

Zijlstra GJ, et al. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2012 Feb;39(2):439-45. doi: 10.1183/09031936.00017911.

## APÊNDICE

**Tabela 3.** Avaliação da hiperresponsividade à metacolina, lavado broncoalveolar, marcadores inflamatórios, remodelamento tecidual, estresse oxidativo, intercepto linear médio e fator de transcrição nas vias aéreas e septos alveolares

Hiperresponsividade à metacolina (%)	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
%Rrs	113,7±14,8	351,6±47,0*	188,9±63,3**	625,1±81,0***	260,7±31,5 <sup>#</sup>	227,3±70,4 <sup>#</sup>	229,3±40,0 <sup>#</sup>
%Ers	77,3±7,5	203,4±33,7*	32,4±3,1*	36,4±4,8*	110,3±28,8 <sup>#</sup>	126,1±24,3 <sup>#</sup>	68,7±17,0
%Raw	96,4±16,2	379,8±62,7*	240,3±38,2 <sup>#</sup>	490,2±37,5*	167,4±39,7 <sup>#</sup>	133,0±59,3 <sup>#</sup>	213,8±57,7 <sup>#</sup>
%Htis	39,0±5,6	72,9±19,0*	19,5±5,4**	24,2±5,0**	53,7±17,9	54,3±11,6	44,5±14,1
%Gtis	54,4±9,9	114,7±12,7*	61,5±8,6**	187,6±21,6***	47,8±15,4 <sup>#</sup>	56,2±17,2 <sup>#</sup>	87,7±18,1 <sup>#</sup>
FLBA (x10 <sup>4</sup> células/mL)	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
Células totais	0,8±0,1	13,6±2,3*	12,6±1,4*	22,2±3,7***	7,1±1,5 <sup>#</sup>	2,5±0,2 <sup>#</sup>	4,9±0,8 <sup>#</sup>
Eosinófilos	0,2±0,05	6,6±1,2*	1,8±0,2 <sup>#</sup>	9,1±1,4*	2,8±0,7 <sup>#</sup>	0,7±0,1 <sup>#</sup>	1,4±0,2 <sup>#</sup>
Macrófagos	0,2±0,03	2,4±0,4*	6,3±0,7*	7,5±1,4*	1,8±0,4 <sup>#</sup>	0,9±0,2 <sup>#</sup>	1,4±0,2 <sup>#</sup>
Neutrófilos	0,1±0,02	2,3±0,4*	3,1±0,5*	4,3±0,5***	1,0±0,3 <sup>#</sup>	0,5±0,1 <sup>#</sup>	1,3±0,4 <sup>#</sup>
Linfócitos	0,2±0,05	1,2±0,2*	1,5±0,3*	2,1±0,4*	1,1±0,2*	0,3±0,1	0,7±0,2 <sup>#</sup>
Marcadores inflamatórios (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
IL-1β - Vias aéreas	0,4±0,1	4,2±0,4*	1,2±0,2**	6,0±0,5***	2,7±0,3 <sup>#</sup>	1,4±0,3 <sup>#</sup>	2,2±0,2 <sup>#</sup>
IL-1β - Septos alveolares	0,2±0,1	2,6±0,3*	0,7±0,2**	4,0±0,3***	0,9±0,2 <sup>#</sup>	0,5±0,1 <sup>#</sup>	1,3±0,2 <sup>#</sup>
IL-4 - Vias aéreas	1,5±0,5	11,3±1,3*	4,1±1,2 <sup>#</sup>	12,2±2,3*	11,9±1,7*	7,9±1,2*	8,7±1,2*
IL-4 - Septos alveolares	1,7±0,3	10,4±0,6*	4,7±0,7 <sup>#</sup>	7,9±0,7 <sup>#</sup>	8,8±0,7*	6,5±0,5*	6,5±0,7*
IL-5 - Vias aéreas	1,7±0,2	11,3±0,7*	6,5±0,5 <sup>#</sup>	8,5±0,6 <sup>#</sup>	2,4±0,4 <sup>#</sup>	6,6±0,5 <sup>#</sup>	2,7±0,5 <sup>#</sup>
IL-5 - Septos alveolares	1,2±0,2	4,4±0,3*	2,9±0,6 <sup>#</sup>	8,0±0,4 <sup>#</sup>	1,9±0,3 <sup>#</sup>	2,0±0,2 <sup>#</sup>	1,7±0,2 <sup>#</sup>
IL-6 - Vias aéreas	0,7±0,4	8,3±0,5*	5,5±0,4 <sup>#</sup>	7,4±0,6*	2,2±0,2 <sup>#</sup>	1,9±0,3 <sup>#</sup>	1,8±0,2 <sup>#</sup>
IL-6 - Septos alveolares	0,4±0,1	6,6±0,4*	7,2±0,5*	12,3±1,1 <sup>#</sup>	1,9±0,2 <sup>#</sup>	1,1±0,2 <sup>#</sup>	1,0±0,2 <sup>#</sup>
IL-10 - Vias aéreas	2,1±0,2	3,3±0,2*	4,1±0,3*	5,2±0,4 <sup>#</sup>	2,8±0,3 <sup>#</sup>	4,1±0,3*	2,3±0,2 <sup>#</sup>
IL-10 - Septos alveolares	3,2±0,3	4,5±0,3*	5,5±0,4*	6,6±0,4 <sup>#</sup>	2,3±0,2 <sup>#</sup>	3,6±0,3 <sup>#</sup>	3,3±0,3 <sup>#</sup>
IL-13 - Vias aéreas	1,7±0,2	10,4±0,7*	7,9±0,7 <sup>#</sup>	11,6±0,6*	4,7±0,4 <sup>#</sup>	5,8±0,4 <sup>#</sup>	4,3±0,3 <sup>#</sup>
IL-13 - Septos alveolares	2,6±0,4	9,2±0,6*	6,7±0,6 <sup>#</sup>	16,9±1,5 <sup>#</sup>	5,2±0,4 <sup>#</sup>	4,2±0,3 <sup>#</sup>	6,0±0,9 <sup>#</sup>
IL-17 - Vias aéreas	2,1±0,2	5,6±0,3*	6,4±0,3*	7,3±0,4*	3,1±0,2 <sup>#</sup>	4,0±0,3 <sup>#</sup>	3,7±0,2 <sup>#</sup>
IL-17 - Septos alveolares	1,5±0,2	6,5±0,3*	8,1±0,4*	8,4±0,6*	2,7±0,2 <sup>#</sup>	4,9±0,3 <sup>#</sup>	3,2±0,6 <sup>#</sup>
IFN-γ - Vias aéreas	0,7±0,2	2,1±0,2	3,3±0,4*	6,2±0,7 <sup>#</sup>	1,1±0,2 <sup>#</sup>	0,3±0,1 <sup>#</sup>	1,9±0,3 <sup>#</sup>
IFN-γ - Septos alveolares	0,7±0,2	2,9±0,3*	2,4±0,3*	3,2±0,3*	1,2±0,2 <sup>#</sup>	0,6±0,2 <sup>#</sup>	0,9±0,2 <sup>#</sup>
TNF-α - Vias aéreas	1,7±0,4	6,2±0,7*	5,3±0,7*	5,0±0,7*	2,8±0,4	5,2±0,7 <sup>#</sup>	4,9±0,7 <sup>#</sup>
TNF-α - Septos alveolares	1,3±0,2	5,5±0,4 <sup>#</sup>	6,2±0,6*	7,7±0,5*	2,1±0,3 <sup>#</sup>	4,5±0,4 <sup>#</sup>	4,8±0,4 <sup>#</sup>
Marcadores de remodelamento tecidual	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
MMP-9 - Vias aéreas (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	0,2±0,03	3,0±0,1*	5,3±0,2*	10,2±0,3 <sup>#</sup>	1,8±0,08 <sup>#</sup>	2,1±0,08 <sup>#</sup>	1,7±0,1 <sup>#</sup>
MMP-9 - Septos alveolares (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	0,5±0,1	2,1±0,08*	4,4±0,1*	8,7±0,3 <sup>#</sup>	1,9±0,1 <sup>#</sup>	2,3±0,1 <sup>#</sup>	1,5±0,1 <sup>#</sup>
MMP-12 - Vias aéreas (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	1,3±0,2	1,9±0,2	2,1±0,4	3,5±0,4 <sup>#</sup>	1,8±0,2 <sup>#</sup>	0,9±0,1 <sup>#</sup>	1,0±0,2 <sup>#</sup>
MMP-12 - Septos alveolares (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	0,4±0,1	0,2±0,08	2,7±0,4*	5,7±0,5 <sup>#</sup>	2,5±0,3 <sup>#</sup>	2,2±0,3 <sup>#</sup>	0,9±0,2 <sup>#</sup>
TGF-β - Vias aéreas (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	0,8±0,3	5,5±1,1*	2,7±0,4 <sup>#</sup>	7,0±0,9*	3,9±0,4 <sup>#</sup>	3,0±0,4 <sup>#</sup>	1,6±0,2 <sup>#</sup>
TGF-β - Septos alveolares (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	0,1±0,07	4,8±0,3*	3,6±0,4*	6,4±0,5 <sup>#</sup>	2,3±0,3 <sup>#</sup>	0,7±0,2 <sup>#</sup>	1,9±0,2 <sup>#</sup>
Fibras colágenas - Vias aéreas (%)	1,6±0,4	12,5±0,4*	0,3±0,1 <sup>#</sup>	12,0±1,7*	1,8±0,4 <sup>#</sup>	1,3±0,2 <sup>#</sup>	3,0±2,4 <sup>#</sup>
Fibras colágenas - Septos alveolares (%)	2,4±0,2	11,3±0,3*	3,9±0,5 <sup>#</sup>	9,0±0,8 <sup>#</sup>	2,9±0,3 <sup>#</sup>	5,7±0,7 <sup>#</sup>	2,5±0,2 <sup>#</sup>
Marcadores de estresse oxidativo	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
iNOS - Vias aéreas (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	3,3±0,5	9,9±1,3*	1,8±0,9 <sup>#</sup>	8,6±0,5*	4,5±0,5 <sup>#</sup>	3,3±0,3 <sup>#</sup>	2,5±0,3 <sup>#</sup>
iNOS - Septos alveolares (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	2,6±0,4	8,6±0,9*	9,2±0,8*	9,4±0,5*	4,3±0,5 <sup>#</sup>	2,8±0,3 <sup>#</sup>	3,1±0,3 <sup>#</sup>
NO exalado (ppb)	12,3±2,1	32,4±4,6*	26,8±3,8*	41,0±5,1*	17,1±5,7 <sup>#</sup>	21,2±3,9 <sup>#</sup>	16,1±2,7 <sup>#</sup>
Intercepto linear médio (µm)	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
Intercepto linear médio	27,2±2,8	29,1±1,8	42,7±1,9*	59,3±1,9 <sup>#</sup>	21,4±0,8 <sup>#</sup>	29,3±1,3 <sup>#</sup>	20,5±0,8 <sup>#</sup>
Fator de transcrição (células/10 <sup>4</sup> µm <sup>2</sup> )	SAL	OVA	ELA	ACO	ACO-pep-BbKI	ACO-DX	ACO-DX-pep-BbKI
NF-Kappa-B - Vias aéreas	0,4±0,1	6,7±0,6*	8,6±0,7 <sup>#</sup>	6,5±0,4*	4,1±0,5 <sup>#</sup>	2,3±0,2 <sup>#</sup>	2,3±0,3 <sup>#</sup>
NF-Kappa-B - Septos alveolares	0,2±0,1	6,2±0,4*	9,0±0,5 <sup>#</sup>	5,9±0,4*	2,8±0,4 <sup>#</sup>	2,0±0,3 <sup>#</sup>	1,6±0,3 <sup>#</sup>

Nota: IL, interleucina; IFN, Interferon; TNF, fator de necrose tumoral; MMP, metaloproteinase; TGF β, fator de crescimento transformador; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; NF-KappaB, fator nuclear KappaB. \*p<0,05 comparado ao grupo SAL; \*\*p<0,05 comparado aos grupos OVA e ELA; #p<0,05 comparado ao grupo ACO; +p<0,05 comparado aos grupos SAL e OVA; ++p<0,05 comparado ao grupo OVA; \$p<0,05 comparado ao grupo ACO-DX; \$\$p<0,05 comparado ao grupo ACO-pep-BbKI.