



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daniele Matheus de Souza


**Papel regulatório da proteína anexina-1 e de seu derivado Ac2-26
no modelo experimental de asma alérgica em camundongos**

Rio de Janeiro

2012

Daniele Matheus de Souza

Papel regulatório da proteína anexina-1 e de seu derivado Ac2-26 no modelo experimental de asma alérgica em camundongos



Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins.

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Daniele Matheus de.
Papel regulatório da proteína anexina-1 e de seu derivado Ac2-26 no modelo experimental de asma alérgica em camundongos / Daniele Matheus de Souza. – 2012.
80 f. : il.

Orientadora: Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Asma – Teses. 2. Pulmões – Doenças – Teses. 3. Alergia respiratória – Teses. 4. Glicocorticoides – Efeitos colaterais. 5. Anexina A1. I. Martins, Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.248

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daniele Matheus de Souza

Papel regulatório da proteína anexina-1 e de seu derivado Ac2-26 no modelo experimental de asma alérgica em camundongos

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de abril de 2012.

Banca Examinadora:

Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Lais de Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Dr. Valber da Silva Frutuoso
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À Deus, por toda benção que me deu.
Aos meus pais, Rosana e Everaldo, por todo amor, compreensão, conselhos,
incentivos e por nunca terem desistido de mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosana Rocha e Everaldo Justino por serem os melhores pais do mundo. Tenho muito orgulho de ser a filha de vocês. Obrigado por tudo. O meu amor por vocês é incondicional.

Aos meus avôs Sonia Maria Matheus e Jair Matheus, a qual amo muito, por serem meus segundos pais;

Ao meu irmão Renato Matheus por sempre me fazer rir e alegrar a minha vida, que seria muito chata sem ele;

A minha orientadora Dr. Patricia Silva por aceitar o desafio da minha orientação e permitir essa grande oportunidade que proporcionou o meu crescimento científico;

Ao chefe de laboratório Dr. Marco Aurélio Martins, e ao pesquisador Dr. Renato Cordeiro, pela honra de poder fazer parte de seu grupo;

Aos pesquisadores Dr. Mauro Perretti e Dr. Roderick Flower pela cessão dos animais nocautes para a proteína anexina-1 para realização desse trabalho;

As minhas duas irmãs de coração Rafaela Gomes e Denise Polonio pela honra de estarem na minha vida e por todo apoio nas horas mais difíceis;

Ao meu namorado Manoel Vitor Guedes pelo companheirismo, carinho e ajuda, tornando esse momento menos difícil. *You make me feel so young*;

As minhas amigas do peito Andressa Moraes, Diana Dalzy, Patrícia Trentin e Suzana Vanessa Cardoso por participarem de forma tão importante e especial na minha vida;

Aos todos os meus amigos que adquiri ao longo da vida pelo carinho, compreensão e pelas boas risadas.

Aos meus amigos de laboratório Bianca Ciambarella, Rafael Torres, Thiago José, Priscilla Olsen, Daniela Insuela, Aline Vieira, Carolina Athar e Luciana Pontes; Aos pesquisadores Ana Lucia Pires, Dra. Edna Valotta, Dra. Mágda Fráguas e Dr. Vinícius Frias pelo conhecimento e a ajuda sempre prestada;

Aos meus colegas de laboratório Ana Carolina Arantes, Rodrigo Azevedo e Rafael Martins por me ajudarem com a parte histológica da minha dissertação;

Aos colegas de laboratório Rafaelle Rodrigues, Gina de Castro, Amanda Cotias, Camila Pão, Caio Victor Machado, Mariana Haddad, Tatiana Paula Ferreira, Natalia de Andrade, Julio Beltrame e Davidson Furtado pelo carinho e ajuda;

Um especial agradecimento à Osirene Loureiro (Dadá) por todo apoio e assistência;

À equipe do biotério setorial e do CECAL por toda a ajuda e cuidados com os animais;

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Biologia Humana e Experimental pelo convívio e aprendizado;

Ao apoio financeiro do CAPES, CNPQ e FAPERJ para a realização deste trabalho.

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

Dalai Lama

RESUMO

SOUZA, Daniele Matheus de. *Papel regulatório da proteína anexina-1 e de seu derivado ac2-26 no modelo experimental de asma alérgica em camundongos*. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiper-reatividade das vias aéreas, acúmulo de eosinófilos, secreção de muco e remodelamento. No decorrer do estabelecimento do processo inflamatório, há liberação de mediadores endógenos que atuam limitando a evolução do quadro patológico e garantindo a manutenção da homeostasia (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Dentre estes recebem destaque os hormônios glicocorticóides, reconhecidos por sua atividade anti-inflamatória, dependente, em parte, da geração de fatores intermediários como a proteína anexina-1 (AnxA1) (KAMAL, FLOWER e PERRETTI, 2005; PERRETTI, 2003). Neste estudo investigou-se o papel regulatório da AnxA1 e do peptídeo derivado Ac2-26 (50 - 200 µg/animal) no modelo experimental de asma alérgica murina. Camundongos BALB/c (AnxA1^{+/+}) e depletados do gene codificante para AnxA1 (AnxA1^{-/-}) foram sensibilizados com ovoalbumina (OVA 50 µg) e hidróxido de alumínio (5 mg), por via subcutânea. Após 14 dias, foi feito reforço com OVA (25 µg), por via intraperitoneal, e nos dias 19, 20 e 21 foram desafiados com OVA (25 µg), por via intranasal. O tratamento consistiu na administração intranasal do peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg), 1 h antes de cada desafio. As análises foram feitas 24 h após o último desafio e incluíram: i) função pulmonar (resistência e elastância) e hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina (3 - 27 mg/ml) através de pletismografia invasiva; ii) alterações morfológicas através de histologia clássica; iii) quantificação de colágeno e iv) quantificação de mediadores inflamatórios através de ELISA. Verificou-se que camundongos AnxA1^{-/-}, quando ativamente sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram exacerbação do quadro de hiper-reatividade das vias aéreas, assim como do número de eosinófilos no lavado broncoalveolar e no infiltrado peribrônquico, deposição de colágeno e nos níveis de IL-13 em comparação aos controles AnxA1^{+/+}. Em paralelo, observou-se que o peptídeo Ac2-26 levou a uma redução da hiper-reatividade das vias aéreas frente à estimulação com metacolina nos animais AnxA1^{+/+}. O peptídeo Ac2-26 reduziu o infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar e o número de eosinófilos peribronquiolares, além da produção de muco no tecido pulmonar e da geração IL-4, IL-13, eotaxina-1 e -2. Em conjunto, nossos achados mostram que os camundongos AnxA1^{-/-} mostraram-se mais responsivos à estimulação antigênica, o que foi indicativo de que a AnxA1 parece exercer um papel regulatório importante sobre a resposta inflamatória alérgica murina. Além disso, o efeito inibitório do peptídeo Ac2-26 sobre a resposta alérgica pulmonar foi indicativo de que este se coloca como um composto anti-inflamatório e anti-alérgico promissor para utilização na terapia da asma.

Palavras-chave: Pulmão. Alergia. Terapia. Glicocorticóides. Anexina-1. Peptídeo Ac2-26.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by airways hyperreactivity, eosinophil accumulation, mucus secretion as well as remodeling. During the establishment of the inflammatory process, endogenous mediators are released in order to limit the progression of the pathological process (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Glucocorticoid hormones are considered as critical based on their potent anti-inflammatory activity, which is at least partially dependent on the release of intermediate factors such as the protein annexin-1 (KAMAL, FLOWER e PERRETTI, 2005; PERRETTI, 2003). In this study, we investigated the role of annexin-1 (AnxA1) and its derived peptide Ac2-26 (50 – 200 µg/animal) on the experimental model of allergic asthma in mice. BALB/c (AnxA1^{+/+}) and AnxA1 knockout mice (AnxA1^{-/-}) were sensitized with subcutaneous injection of ovalbumin (OVA 50 µg) plus aluminum hydroxide (5 mg). On day 14, animals were boosted intraperitoneally with OVA (25 µg) and on days 19, 20 and 21 post-sensitization, mice were challenged intranasally with OVA (25 µg). Treatment was performed by intranasal administration of Ac2-26 peptide (50 - 200 µg), 1 h before each challenge. The analyses were made 24 h after the last provocation and included: i) lung function (resistance and elastance) and airways hyperreactivity to methacholine (3-27 mg/ml) by invasive plethysmography, ii) morphology by classical histological techniques; iii) collagen quantification and iv) cytokine generation evaluated by ELISA. It was noted that AnxA1^{-/-} mice, when sensitized and challenged with OVA showed exacerbation of airways hyperreactivity, eosinophils present in the bronchoalveolar lavage and peribronchial tissue, collagen deposition and increased levels of IL-13 as compared to AnxA1^{+/+}. In parallel, it was shown that treatment of AnxA1^{+/+} mice with the Ac2-26 peptide markedly inhibited airways hyperreactivity, peribronchial eosinophil accumulation, mucus production and the generation of IL-13 and eotaxin-1 and -2. Taken together our results show that AnxA1^{-/-} mice were more responsive to antigen stimulation, which is indicative that AnxA1 plays an important regulatory role in the murine allergic inflammatory response. In addition, the inhibitory effect of the Ac2-26 peptide on the allergic lung inflammation clearly indicated that it seems to be a promising anti-inflammatory and anti-allergic agent to be used in the asthma therapy.

Keywords: Lung. Allergy. Therapy. Glucocorticoids. Annexin-1. Ac 2-26 peptide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processo de sensibilização e indução de memória.....	21
Figura 2 -	Fase imediata da reação da reação alérgica.....	22
Figura 3 -	Reação de fase tardia da inflamação induzida por alérgeno.....	24
Figura 4 -	Fisiopatologia da asma.....	27
Figura 5 -	Análise da função pulmonar de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	44
Figura 6 -	Análise do infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	46
Figura 7 -	Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	47
Figura 8 -	Infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar de camundongos AnxA1 ^{-/-} e AnxA1 ^{+/+} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	49
Figura 9 -	Avaliação da deposição de componentes de matriz extracelular na região peribrônquilar do pulmão de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	50
Figura 10 -	Quantificação do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina através da técnica de Sircol.....	51
Figura 11 -	Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos AnxA1 ^{+/+} AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	53
Figura 12 -	Análise da produção de muco no pulmão de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	54
Figura 13 -	Análise quantitativa da produção de muco no tecido pulmonar de camundongos AnxA1 ^{+/+} e AnxA1 ^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.....	55
Figura 14 -	Análise da função pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal).....	57
Figura 15 -	Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal).....	59

Figura 16 - Infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar em camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal).....	60
Figura 17 - Avaliação da deposição de componentes de matriz extracelular na região peribrônquilar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 -200 µg/animal).....	62
Figura 18 - Quantificação do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 100 µg/animal) por técnica de Sircol.....	63
Figura 19 - Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal) por técnica de ELISA.....	64
Figura 20 - Avaliação da produção do muco nas vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal).....	66
Figura 21 - Análise quantitativa da produção de muco em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal).....	67

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ALXA ₄	Lipoxina A ₄
AMPC	Adenosina 3,5'-monofosfato cíclica
AnxA1	Proteína Anexina-1
AnxA1 ^{-/-}	Nocaut para a proteína anexina-1
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
BAL	Lavado broncoalveolar
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
Ca	Cálcio
CBP	Proteínas ligantes de CREB
CEUA	Comitê de Ética e Uso de animais
cPLA2	Fosfolipase A2 citosólica
CysLT1	Receptor cisteinil leucotrieno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etileno diamino tricloro acético
EPM	Erro Padrão da Média
FcεRI	Receptores Fc de alta afinidade
fMLP	n-formil-metionil-fenilalanina
Foxp	<i>Forkhead Box protein 3</i>
FRP	Receptor formilado
GILZ	Proteína leucina zíper induzida por corticóide
GM-CSF	Fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos
GR	Receptor de glicocorticóide
GRE	Elementos responsivos aos glicocorticóides
H ₃ BO ₄	Ácido bórico
HAT	Acetiltransferase de histonas
HDAC2	Histonas desacetilase-2

HE	Hematoxilina & Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HRP	Neutravidina- <i>horseradish peroxidase</i>
IgE	Imunoglobulina E
IκB	Inibidor do NF-κB
IL	Interleucina
i.n.	Intranasal
INFγ	Interferon gama
i.p	Intraperitoneal
K	Potássio
KPO ₄	Fosfato de potássio
LTB ₄	Leucotrieno B4
LTC ₄	Leucotrieno C4
LTD ₄	Leucotrieno D4
M	Molar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MKP-1	MAP quinase fosfatase-1
MMPs	Metaloproteases de matriz
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato-salino
pCAF	Fator associado ao p300-CBP
PDE	Fosfodiesterase
PKA	Proteína quinase A
PLA ₂	Fosfolipase A2
PS	Fosfatidilserina
RNA	Ácido ribonucleico
SAA	Proteína soro amiloide
SLPI	Inibidor de leucoprotease secretória
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição

TCR	Receptor de reconhecimento das células T
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteases
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	ASMA	18
1.1	Mecanismo da asma alérgica	19
1.1.1	<u>Bases imunológicas da asma</u>	19
1.1.2	<u>Fase imediata e fase tardia da asma</u>	22
1.2	Fisiopatologia da asma	24
1.3	Estratégias terapêuticas	28
1.3.1	<u>Broncodilatadores</u>	28
1.3.1.1	Agonistas β 2-adrenérgicos.....	28
1.3.1.2	Inibidores de fosfodiesterases.....	29
1.3.1.3	Antagonistas de leucotrienos.....	29
1.3.2	<u>Anti-inflamatórios</u>	30
1.3.2.1	Estabilizadores de mastócitos.....	30
1.3.2.2	Imunoterapia alérgeno-específica.....	30
1.3.2.3	Glicocorticóides.....	31
1.4	Anexina-1 e Peptídeo Ac2-26	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivo específico	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Animais	38
3.2	Modelo de asma alérgica aguda	38
3.3	Tratamento com o peptídeo Ac2-26	38
3.4	Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas	39
3.5	Avaliação do perfil de células inflamatórias no lavado broncoalveolar	39
3.6	Análise histopatológica	40
3.7	Análise morfométrica no tecido pulmonar	41
3.8	Quantificação de colágeno no tecido pulmonar	41
3.9	Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA	41

3.10	Análise estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Avaliação do papel da proteína anexina-1 na inflamação alérgica pulmonar	43
4.1.1	<u>Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	43
4.1.2	<u>Infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	45
4.1.3	<u>Alterações morfológicas no pulmão de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	45
4.1.4	<u>Infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	48
4.1.5	<u>Deposição de matriz extracelular de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	48
4.1.6	<u>Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	52
4.1.7	<u>Quantificação da produção de muco nas vias aéreas de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente</u>	52
4.2	Efeitos do peptídeo Ac2-26 sobre a resposta inflamatória induzida por antígeno em camundongos da cepa BALB/c	56
4.2.1	<u>Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos provocados por antígeno</u>	56
4.2.2	<u>Análise do infiltrado inflamatório pulmonar em camundongos provocados antigenicamente</u>	58
4.2.3	<u>Deposição de matriz extracelular no tecido pulmonar de camundongos provocados antigenicamente</u>	61
4.2.4	<u>Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos provocados antigenicamente</u>	61
4.2.5	<u>Quantificação da produção de muco nas vias aéreas de camundongos provocados antigenicamente</u>	65
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO

1 ASMA

A asma, uma doença multifatorial complexa relacionada ao sistema respiratório, caracteriza-se pela obstrução reversível das vias aéreas, denso infiltrado inflamatório e hiperresponsividade brônquica a estímulos externos, incluindo frio/calor/umidade, exercícios e estresse emocional (LLOYD *et al*, 2009; KODIMUTHALI *et al*, 2008). A predisposição à produção de IgE, que caracteriza os indivíduos atópicos, é um fator importante na patogenia da asma, cujo quadro é marcado por degranulação de mastócitos, aumento no número de células T helper-2 (T_h2) e uma infiltração de eosinófilos nas vias aéreas. Essa infiltração de eosinófilos parece estar associada a mudanças estruturais, incluindo fibrose, hipertrofia muscular, angiogênese, aumento da produção de muco e hiperplasia das glândulas submucosas (BARNES, 2004; ROLPH, 2006; LAZZAR e PANETTIERRI, 2006).

A incidência da asma tem aumentado globalmente, colocando uma carga crescente nos serviços de saúde tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (BARNES, 2008). Nos últimos 20 anos, a prevalência de asma quase dobrou, afetando aproximadamente 8% a 10% da população norte-americana. Esta epidemia tem sido atribuída ao estilo de vida ocidental, que inclui o aumento da exposição a alérgenos, poluição e uma estimulação reduzida do sistema imunológico durante os períodos críticos do desenvolvimento (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Atualmente acomete aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo, e este valor deverá subir para 400 milhões de pessoas nos próximos 15 a 20 anos. Durante a segunda metade do século XX, a asma foi a única doença crônica tratável que aumentou em prevalência e em número de internações (ADCOCK, CARAMORI e CHUNG, 2008).

No Brasil, segundo o DATASUS, anualmente ocorrem 350.000 internações por asma, constituindo-se como a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (2,3% do total) e a terceira causa entre crianças e jovens adultos (ESTATÍSTICAS DE SAÚDE E MORTALIDADE, 2005). Em 2004, os custos com internação por asma foram superiores a R\$ 106 milhões, cerca de 2,8% do gasto

total anual e o terceiro maior valor gasto com uma doença (SISTEMA DE INFORMAÇÕES HOSPITALARES DO SUS, 2004).

A primeira manifestação da asma alérgica pode ocorrer em qualquer idade, sendo a maior incidência em crianças. Quando apresentada na infância geralmente abranda durante a adolescência, porém pode voltar na vida adulta (JENKINS *et al*, 2004).

Atualmente, recomenda-se que o manejo dos pacientes deva ser baseado na gravidade da doença. Dessa forma, a asma pode ser classificada como intermitente e persistente, esta última pode ser subdividida em leve, moderada e grave. Os critérios de classificação da gravidade da asma são baseados em parâmetros como sintomas, exame físicos, bem como a função pulmonar e saturação de oxigênio (POLLART *et al*, 2011). No Brasil, estimam-se que 60% dos casos de asma sejam intermitentes, 25% a 30% persistentes moderados e 5% a 10% persistentes graves. Ressalta-se que embora a proporção de asmáticos graves represente a minoria, ela representa a maior parcela na utilização dos recursos de saúde (IV DIRETRIZES BRASILEIRAS PARA O MANEJO DA ASMA, 2006).

1.1 Mecanismo da asma alérgica

Os mecanismos que estão associados ao desenvolvimento da asma envolvem diversas células inflamatórias e múltiplos mediadores que resultam numa alteração patológica que caracteriza a asma (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004).

1.1.1 Bases imunológicas da asma

Em indivíduos sadios a inalação de alérgenos não induz resposta inflamatória porque as barreiras protetoras do trato respiratório garantem a manutenção da tolerância imunológica (RENAULT, 2001). Indivíduos predispostos para desenvolver asma apresentam o epitélio das vias aéreas danificados aumentando a possibilidade da entrada do alérgeno inalado. Ao ultrapassar a barreira do trato respiratório, o alérgeno é captado e processado por células apresentadoras de antígenos (APC), que geralmente são células dendríticas e macrófagos alveolares. As células dendríticas são consideradas poderosas células apresentadoras de antígenos, e no pulmão estão distribuídas nas vias aéreas condutoras, no interstício pulmonar, nos

vasos, na pleura e nos linfonodos bronquiais (LAMBRECHT e HAMMAD, 2009). Quando ativadas pela presença do alérgeno, as células dendríticas migram para os nodos linfoides ou para sítios na mucosa local e apresentam peptídeos derivados desse alérgeno a linfócitos T virgens (*naive* ou T_{h0}) via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Figura 1). A apresentação do antígeno juntamente com sinais co-estimuladores, leva ativação rápida desses linfócitos T virgens, as quais adquirem perfil de células T Helper 2 (T_{h2}), um subtipo de linfócitos T auxiliares (CD4+), (HOLGATE e POLOSA, 2008; MUDORCH e LLOYD, 2009).

Nas vias aéreas as células T CD4 específicas para este alérgeno podem reconhecer o antígeno apresentado pelas células apresentadoras de antígenos através do TCR (receptor de reconhecimento das células T) (RENAULT, 2001). A ativação dos linfócitos T CD4 é de grande importância na orquestração da inflamação das vias aéreas, devido à diferenciação desta célula em diferentes subpopulações como T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} ou células T regulatórias (Treg). A diferenciação das células T CD4 virgens nas diferentes subpopulações depende de estímulos diferenciados produzidos pelas APCs. No caso das células T_{h1} , a APC secreta a citocina IL-2 que age através do fator de transdução de sinal e ativador da transcrição 4 (STAT4) estimulando a expressão da citocina interferon gama (IFN- γ), o qual ativa o STAT1, induzindo a expressão do fator de transcrição T-bet e culminando na produção de citocinas do perfil T_{h1} . Se as células T virgens foram estimuladas na presença de TGF- β , IL-6, IL-21 ou IL-23 ocorre ativação do STAT3, com consequente indução do fator de transcrição ROR γ t que induz a diferenciação de uma subpopulação denominada de T_{h17} , caracterizada pela produção da citocina IL-17A e IL-17F. As células T_{h17} estão associadas com inflamação neutrofílica nas vias aéreas de pacientes com o quadro asmático grave. Se as células T CD4 virgens receberem o estímulo das citocinas TGF- β e IL-2, ocorre a ativação do fator de transcrição *Forkhead Box protein 3* (Foxp3), o qual induz a formação de células T regulatórias. Quando as células T CD4 são ativadas na presença de IL-4, ocorre a estimulação de STAT6, que induz a ativação do fator de transcrição GATA-3, responsável pela expressão das citocinas do perfil T_{h2} (MURPHY e REINER, 2002; HOLGATE e POLOSA, 2008). Foi demonstrado recentemente que além da T_{h2} há outra população que produz grande quantidade de IL-9. Esta subpopulação, diferenciada na presença de TGF- β e IL-4, foi denominada de T_{h9} (SOROOSH e DOHERT, 2009).

Doenças alérgicas estão fortemente associadas com a subpopulação T_H2 dos linfócitos T CD4, uma vez que o padrão de citocinas do tipo T_H2 foi associado à patogênese das doenças atópicas. (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). O perfil de mediadores secretados pelo fenótipo T_H2 inclui interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), os quais possuem grande importância amplificando a inflamação alérgica na asma (NAKAJIMA e TAKATSU, 2007). Essas citocinas estão envolvidas em vários processos da resposta inflamatória, como na mudança de classe dos linfócitos B para a síntese de imunoglobulina E (IgE), induzida pela IL-4 e IL-13 (Figura 1), o recrutamento de mastócitos por IL-4, IL-9 e IL-13 e a maturação de eosinófilos por IL-3, IL-5 e GM-CSF e basófilos por IL-3 e IL-4 (HOLGATE e POLOSA, 2008).

As IgEs produzidas pelos linfócitos B podem alcançar a corrente sanguínea e ligam-se a receptores Fc (fragmento cristalizável) de alta afinidade (FcεRI) presentes na superfície de mastócitos teciduais ou basófilos sanguíneos. Essas células uma vez sensibilizadas são ativadas pelo alérgeno, tornando o indivíduo sensibilizado a um alérgeno específico (MURDOCH e LLOYD, 2009).

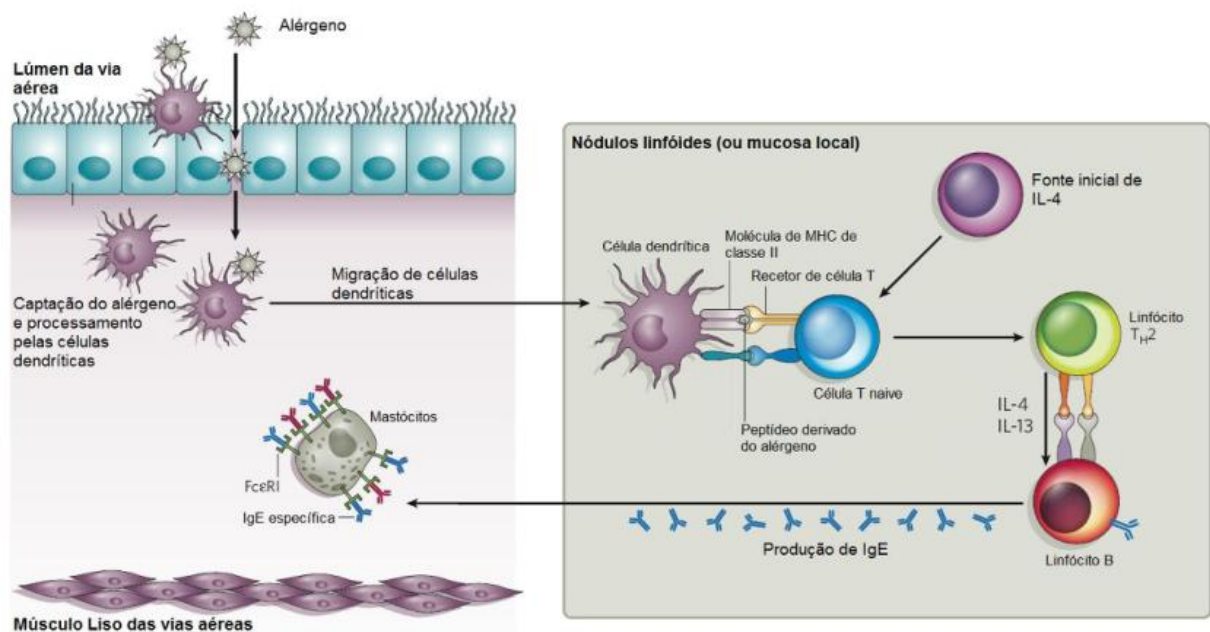


Figura 1. Processo de sensibilização e indução de memória: O alérgeno pode ser reconhecido por células dendríticas que migram para os nódulos linfóides e promovem a ativação dos linfócitos T através da apresentação antigênica. Os linfócitos T ativados proliferam e produzem mediadores inflamatórios, incluindo IL-4 e IL-13. A presença dessas citocinas e a ligação de moléculas co-estimuladoras promovem a mudança de classe de imunoglobulina para IgE específica para o antígeno nos linfócitos B. Adaptado de GALLI *et al*, 2008.

1.1.2 Fase imediata e fase tardia da asma

A resposta asmática pode ser dividida em duas fases que se diferenciam pela ordem temporal e pelos eventos. Uma vez inalado por um indivíduo previamente sensibilizado, o alérgeno liga-se às IgEs que estão associadas aos receptores específicos de alta afinidade (FcεRI), situados nas membranas dos mastócitos e basófilos (HOLGATE e POLOSA, 2008) (Figura 2). A ligação desencadeia inúmeros eventos intracelulares, que incluem principalmente a degranulação e a liberação de mediadores pré-formados como as proteases, aminas vasoativas (histamina), leucotrienos, prostaglandinas e as citocinas e quimiocinas (MUDORCH e LLOYD, 2009) (Figura 2). Estes mediadores induzem a fase inicial da reação asmática, que é diretamente responsável pela hiperresponsividade das vias aéreas e caracterizada pela secreção de muco e vasodilatação. Esta fase apresenta um tempo de duração de aproximadamente 30 a 60 minutos (MUDORCH e LLOYD, 2009).

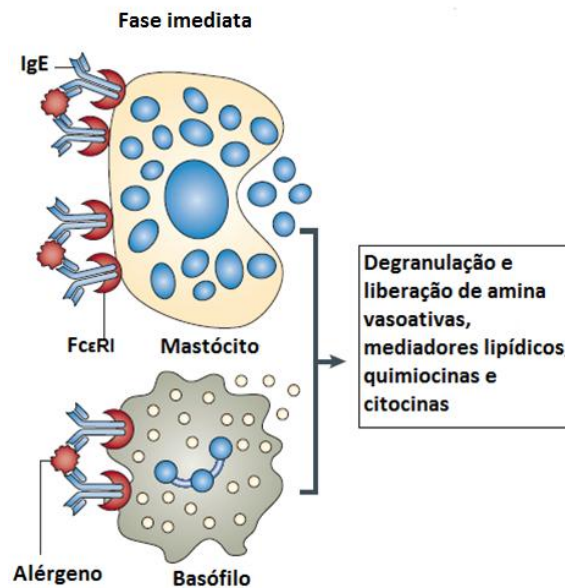


Figura 2. Fase imediata da reação: O reconhecimento do alérgeno pelas IgEs específicas ligadas aos receptores FcεRI dos mastócitos e basófilos promove a ativação destas células que secretam mediadores pré-formados e derivados de lipídeos, e aumentam a síntese de inúmeras citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que culminam nos sintomas imediatos da asma alérgica. Adaptado de LARCHÉ *et al*, 2006.

A fase tardia da reação asmática consiste inicialmente no acúmulo de infiltrado celular no tecido pulmonar e ocorre aproximadamente de 4 a 6 horas. Os mediadores (citocinas e quimiocinas) liberados pelas células na fase inicial recrutam principalmente macrófagos, eosinófilos e linfócitos T_h2 para o sítio inflamatório, estabelecendo assim a fase tardia (MUDORCH e LLOYD, 2009; HOLGATE e POLOSA, 2008).

Uma característica essencial na asma é a presença de eosinófilos, que são os principais constituintes do infiltrado inflamatório pulmonar em indivíduos asmáticos. A diferenciação terminal e a mobilização de eosinófilos da medula óssea são dirigidas pela IL-5 secretada durante reação de fase inicial e tardia (AKUTHOTA *et al*, 2008). Eosinófilos ativados podem produzir e secretar mediadores lipídicos (LTC₄, LTB₄ e PAF), proteínas básicas, citocinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF- α) e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de linfócitos T_h2 (HAMID e TULIC, 2009; TATTERSFIELD *et al*, 2002). Recentemente observou-se que os eosinófilos podem modular a resposta imune adaptativa e atuar como células apresentadoras de antígeno, agindo como amplificadores do processo inflamatório no sítio da inflamação (BARRET e AUSTEN, 2009).

A liberação de mediadores inflamatórios provenientes dos linfócitos T_h2 e dos eosinófilos contribuem para os sintomas clínicos da asma, através dos seus efeitos no tecido vascular das vias aéreas e na reatividade do músculo liso (MUDORCH e LLOYD, 2009) (Figura 3).

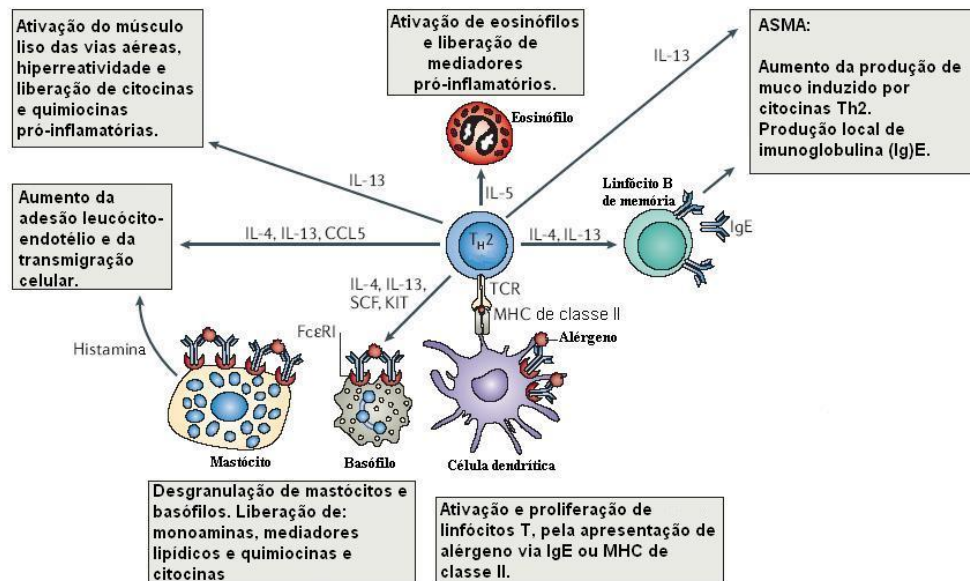


Figura 3. Reação de fase tardia da inflamação induzida por alérgeno. A reação de fase tardia reflete as ações de células imunes que foram recrutadas da circulação e a secreção de mediadores pelas células residentes do tecido pulmonar. Adaptado de LARCHÉ *et al.*, 2006.

Quando a exposição ao alérgeno é contínua e repetitiva, a inflamação das vias aéreas persiste acarretando em alterações estruturais e funcionais nos órgãos afetados. Essas alterações levam a consequências patológicas graves nas vias aéreas de pacientes com asma crônica e estão correlacionadas com o declínio da função pulmonar (GALLI *et al.*, 2008).

1.2 Fisiopatologia da asma

Na asma, a inflamação pode envolver todas as camadas da parede das vias aéreas e tipicamente está associada com o aumento do número e tamanho de células caliciformes, aumento da produção de citocinas e de quimiocinas pelas células epiteliais, inflamação substancial da submucosa, deposição de fibras na lâmina reticular, aumento no desenvolvimento de miofibroblastos e da vascularidade, além de alterações nas células musculares lisas (LAZAAR e PANETTIERI, 2004; WALTERS *et al.*, 2008). A parede das vias aéreas é infiltrada com eosinófilos e

células mononucleares, que são na sua maioria linfócitos T CD4. Os mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos também estão aumentados em número no tecido pulmonar em indivíduos asmáticos. No lúmen das vias aéreas, o muco está misturado com células efetoras ativas, incluindo macrófagos, linfócitos T_{h2} e eosinófilos. Nos casos mais graves há um aumento do número de neutrófilos (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004).

Mudanças estruturais na parede das vias aéreas, comumente denominadas como remodelamento, é resultado da interação de mediadores inflamatórios com células do estroma ou com o tecido lesionado (Figura 3). Fatores locais, incluindo as células estruturais das vias aéreas e a matriz extracelular, respondem a inflamação de forma característica e coordenada na tentativa de reparar o dano causado pela inflamação local. O espessamento da parede das vias aéreas pode variar de 10 a 300%, quando comparado às vias aéreas de indivíduos saudáveis, acarretando numa redução do diâmetro do lúmen das vias aéreas. Além das células inflamatórias, a maioria dos elementos do trato respiratório contribui para o espessamento e obstrução das vias aéreas (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Ocorre a hipertrofia das células caliciformes secretoras de muco, e a metaplasia do epitélio das vias aéreas, que passam também a secretar muco (Figura 3). As citocinas de perfil T_{h2} como a IL-9 e IL-13 podem induzir a hipersecreção de muco, a qual resulta no estreitamento das vias aéreas e nos casos mais graves leva a oclusão (AL-MUHSEN, JOHNSON e HAMID, 2011). Os fibroblastos são ativados e diferenciados em miofibroblastos, que secretam mediadores pró-inflamatórios e proteínas da matriz extracelular, como colágeno (tipo I, III e V), fibronectina e tenascinina sob a membrana basal, na lâmina reticular (AL-MUHSEN, JOHNSON e HAMID, 2011 e ROBERTS *et al*, 1997). Os proteoglicanos e glicosamicoglicanos também estão presentes em grande quantidade na matriz extracelular (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004).

O mecanismo de deposição de matriz extracelular no tecido é determinado pelo balanço entre a produção e degradação de proteínas fibrilares. A degradação das proteínas da matriz extracelular é regulada pelas metaloproteases de matriz (MMPs) e pelos inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs). As MMPs degradam proteínas fibrilares enquanto que as TIMPs inibem a atividade das MMPs. A colagenase (MMP-1 e MMP-13) degrada o colágeno intersticial, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) degradam componentes da membrana basal. A MMP-9 é a metaloprotease de matriz mais relevante no quadro asmático e no remodelamento

das vias aéreas (TANG *et al*, 2006). Na asma, o aumento da expressão de TIMP-1 causa deposição de matriz extracelular e o espessamento da membrana basal pela inibição da degradação da matriz. A proporção entre MMP-9 e TIMP-1 em asmáticos está reduzida e se correlaciona com o grau de obstrução das vias aéreas. Além disso, o fator de crescimento transformador (TGF- β) sintetizado por uma variedade de células, incluindo células epiteliais, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e fibroblastos, estimula a produção de matriz extracelular. Outras citocinas, incluindo a IL-13 são consideradas mediadores pró-fibróticos importantes na patogênese da asma (WYNN, 2004; LLOYD e ROBISON, 2007).

Em adição, ocorre a dilatação dos vasos sanguíneos e angiogênese, que acarreta no aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente no edema na parede das vias aéreas (HOMER e ELIAS, 2000) (Figura 3).

O remodelamento e a inflamação das vias aéreas resultam na hiperresponsividade e obstrução das vias aéreas, ocasionando a falta de ar e o chiado característico na asma. A hiperresponsividade das vias aéreas tem como definição a exacerbação da broncoconstrição induzida por um estímulo não específico e constitui uma das principais características clínicas da asma, ocorrendo de forma proporcional à gravidade da doença. Além disso, outros fatores incluindo a redução do diâmetro da via aérea, o aumento da contratilidade da musculatura lisa, o grau de lesão epitelial, a disfunção da regulação neuronal, aumento da permeabilidade microvascular, além do aumento da produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios, tem sido associados com a hiperresponsividade das vias aéreas (AL-MUHSEN, JOHNSON e HAMID, 2011). Essas alterações estruturais modificam a arquitetura das vias aéreas, tornando-a mais espessa, menos complacente e reduzindo o seu lúmen (AL-MUHSEN, JOHNSON e HAMID, 2011).

A inflamação e as mudanças estruturais descritas acima foram observadas em biópsia de via aérea de crianças portadoras de asma, de forma anterior ao aparecimento dos sintomas da doença (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Com isso acredita-se que o sintoma de obstrução das vias aéreas e de sibilo ocorre apenas quando um nível crítico de remodelamento tecidual tenha se manifestado. Em alguns indivíduos, adultos ou crianças, os sintomas da doença desaparecem ao longo da vida. Mesmo na ausência de sintomas, os indivíduos asmáticos continuam apresentando aumento da responsividade brônquica induzida por metacolina, e em

biopsias do tecido pulmonar e o lavado broncoalveolar mostram elevado número de eosinófilos, sugerindo um futuro aparecimento dos sintomas em algum momento da vida. De fato, a maioria desses indivíduos desenvolve os sintomas da asma novamente. Ao longo do tempo, a função pulmonar de indivíduos asmáticos reduz rapidamente quando comparado com indivíduos saudáveis, indicando a progressão da doença (AL-MUHSEN, JOHNSON e HAMID, 2011).

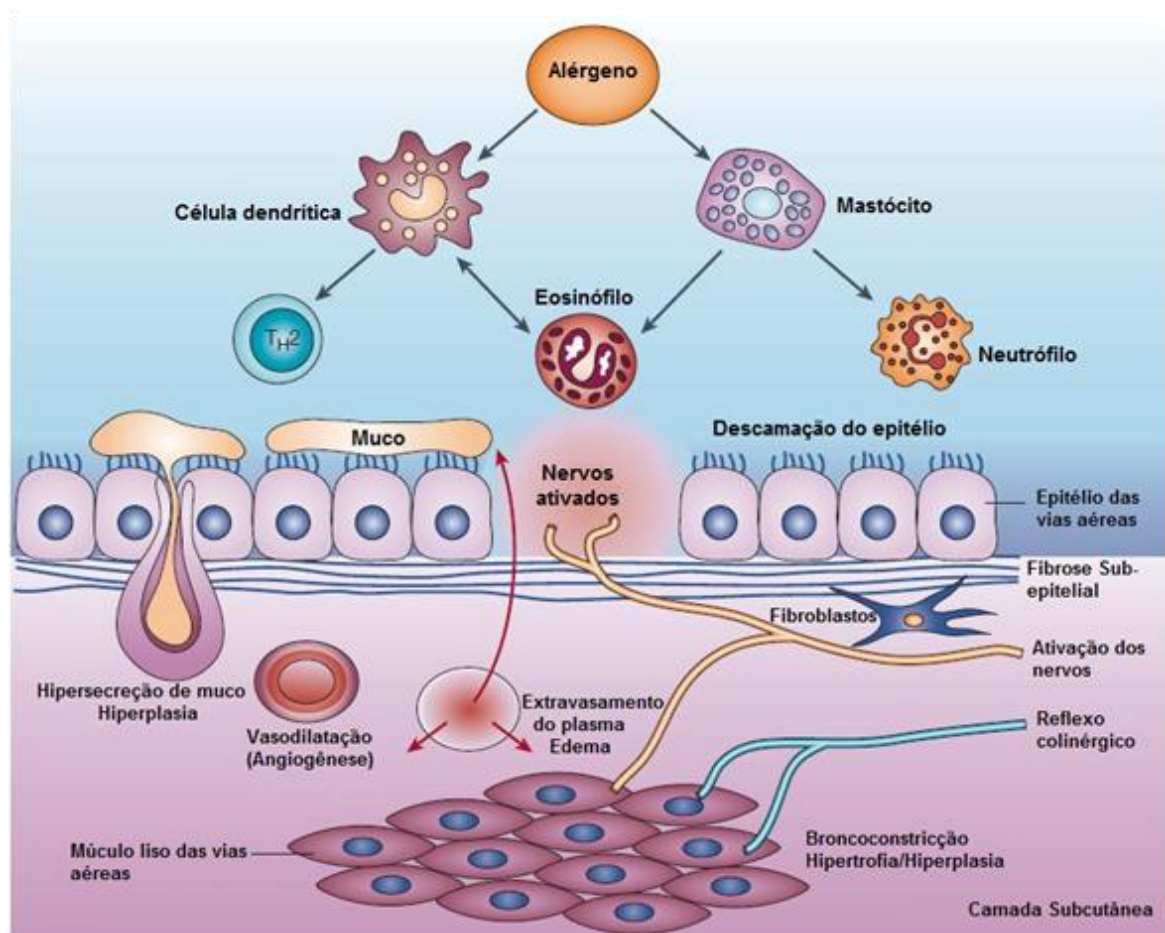


Figura 4. Fisiopatologia da asma. Recrutamento e ativação de células inflamatórias nas vias aéreas. A liberação de mediadores inflamatórios resulta em broncoconstrição, extravasamento do plasma, vasodilatação, hipersecreção de muco, ativação de nervos sensoriais, hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas e broncoconstrição induzida por reflexos colinérgicos. Além desses efeitos, ocorrem mudanças estruturais incluindo fibrose subepitelial, angiogênese, aumento do número de células produtoras de muco, e espessamento da camada de células musculares lisas das vias aéreas. Adaptado de BARNES, 2004.

1.3 Estratégias terapêuticas

A asma é uma doença complexa que envolve muitas células inflamatórias, mediadores químicos e células estruturais das vias aéreas. Essa complexidade deve-se à combinação de fatores ambientais e genéticos e manifesta-se em muitos níveis incluindo etiologia, patogênese, prognóstico, e na resposta ao tratamento (ROLPH *et al.*, 2006). Sendo assim, tratamentos que visem bloquear apenas uma célula ou um mediador são muitas vezes ineficientes. Atualmente, a terapia para a asma tem como principal objetivo atingir e manter o controle clínico dos sintomas, para isso as principais estratégias são a prevenção e reversão da inflamação e relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas. A terapia convencional baseia-se na utilização de corticóides associados ao uso de broncodilatadores agonistas dos receptores β 2-adrenérgicos (HOLGATE e POLOSA, 2008). Alguns fármacos relevantes para o tratamento da asma serão descritos adiante.

1.3.1 Broncodilatadores

1.3.1.1 Agonista β 2-adrenérgicos

Os agonistas β 2-adrenérgicos são broncodilatadores mais potentes em uso clínico atualmente. São encontrados em diversas formas de utilização, como soluções de inalação, nebulização e comprimidos, que lhe dão ampla versatilidade clínica (LEMANSKE e BUSSE, 2003).

Os agonistas β 2 ativam diretamente os receptores β 2 nas células musculares lisas das vias aéreas. Os receptores β 2 são amplamente distribuídos nas vias aéreas e estão presentes em diversos tipos celulares que participam da patogênese da asma (BARNES, 1997). Após a ligação desses agonistas no adrenoreceptor β 2, a adenilato ciclase é estimulada pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína Gs, e converte a adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3,5'-monofosfato cíclica (AMPc), a qual ativa a proteína quinase A (PKA). Essa enzima promove o relaxamento do músculo liso através da fosforilação da miosina de cadeia leve e pela abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependente de potássio (K^+), aliviando a broncoconstrição na asma (HOLGATE e POLOSA, 2008). Além disso, os agonistas β 2 inibem a

neurotransmissão colinérgica nas vias aéreas humanas, reduzindo a broncoconstrição induzida por esta via (BARNES, 1997).

Além da ação relaxante da musculatura lisa das vias aéreas, os β_2 agonistas atuam na melhora do *clearance* mucociliar, na diminuição da permeabilidade vascular e pode modular a liberação de mediadores nos mastócitos. Contudo, sua utilização é limitada pelos efeitos adversos e pela dificuldade de adequação ao tratamento apresentada por alguns pacientes. Os efeitos adversos estão associados a altas doses do agonista β_2 -adrenérgicos, sendo os efeitos mais frequentes tremores, câimbras, taquicardias, aumento da ansiedade e distúrbios metabólicos (LAMANSKE e BUSSE, 2003).

Atualmente a melhor estratégia terapêutica utilizada na asma é a associação dos β_2 -agonistas com os glicocorticóides inalados (NELSON, 2006).

1.3.1.2 Inibidores de fosfodiesterases

A teofilina é uma xantina utilizada como broncodilatador, mas que pode ter efeitos anti-inflamatórios leves. O mecanismo de ação pelo qual a teofilina induz a broncodilatação é a inibição não seletiva da fosfodiesterases (PDE), com consequente aumento de AMPc (BOSWELL-SMITH, CAZZOLA E PAGE, 2006; LEMANSKE E BUSSE, 2003).

Devido ao seu baixo custo, a teofilina ainda é utilizada em muitos países para tratar a asma leve e a grave que são resistentes a glicocorticóides (BOSWELL-SMITH, CAZZOLA E PAGE, 2006; LEMANSKE E BUSSE, 2003). Entretanto a teofilina possui efeitos colaterais, como náuseas, anorexia e vômitos, devido à estreita janela terapêutica (BARNES, 1997).

1.3.1.3 Antagonistas de leucotrienos

Os leucotrienos são derivados de ácidos graxos, através do metabolismo do ácido araquidônico. Os cisteinil leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) podem ser gerados por eosinófilos, mastócitos e macrófagos alveolares, e exercem seus efeitos pela ligação aos receptores específicos, CysLT₁ e CysLT₂. A maioria das ações dos cisteinil leucotrienos são mediadas pela interação com o receptor CysLT₁, que pode

ocasionar a contração do musculatura lisa das vias aéreas, quimiotaxia de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular (LEMANSKE e BUSSE, 2003).

As ações dos leucotrienos podem ser prevenidas pela inibição da síntese dos cisteinil leucotrienos ou pelos antagonistas dos seus receptores, sendo estes últimos os mais utilizados no tratamento da asma (LEMANSKE e BUSSE, 2003).

A principal vantagem desses fármacos é que eles são eficazes por via oral e não apresentam efeitos adversos sérios. Contudo, eles são considerados muito menos eficazes e mais caros que os glicocorticóides (LAZZAR e PANETTIERI, 2004; BARNES, 2004).

1.3.2 Anti-inflamatórios

1.3.2.1 Estabilizadores de mastócitos

O cromoglicato de sódio e o nedocromil sódico são compostos utilizados no tratamento da asma crônica, e apesar de possuírem propriedades similares, suas estruturas são diferentes (LEMANSKE e BUSSE, 2003). Embora, acredita-se que os efeitos anti-inflamatórios produzidos pelas cromonas devam-se unicamente à estabilização da membrana de mastócitos, inibindo a liberação de mediadores inflamatórios, estes fármacos podem também inibir outras células inflamatórias, nervos sensoriais, broncoconstrição induzida por alérgeno e reduzir a hiperresponsividade das vias aéreas (BARNES, 2004; LEMANSKE e BUSSE, 2003).

As cromonas não são eficazes no tratamento de todos os pacientes, sendo difícil prever quais irão responder à terapia. Além disso, devido à curta duração, as cromonas inaladas devem ser administradas quatro vezes ao dia, um regime inconveniente para o tratamento profilático da asma. Os efeitos colaterais das cromonas são restritos a irritações na mucosa das vias aéreas. (BARNES, 1997).

1.3.2.2 Imunoterapia alérgeno-específica

A imunoterapia alérgeno-específica é uma terapia recomendada para doenças alérgicas como a rinite, hipersensibilidade a venenos, alergia a fármacos e para asma intermitente e persistente leve. Esta terapia é realizada através da

administração de doses crescentes do alérgeno clinicamente relevante até que ocorra a indução de tolerância imunológica (LARCHÉ, AKDIS e VALENTA, 2006).

Os principais mecanismos de ação da imunoterapia alérgeno-específica ocorrem através do aumento do número e da atividade das células T regulatórias (células Treg), que produzem altos níveis das citocinas IL-10 e TGF- β . Estas duas citocinas atenuam a resposta das células T_H2. Além disso, a imunoterapia alérgeno-específica induz a redução da produção de anticorpos IgE e o aumento da produção de IgG4 específico ao alérgeno, que culmina na redução da ativação de mastócitos e basófilos. Estes efeitos acarretam uma redução dos sintomas do paciente e a necessidade de medicação, melhorando a hiperresponsividade das vias aéreas (AKDIS e AKDIS, 2011).

Os efeitos colaterais deste tratamento podem ser localizados, com respostas alérgicas limitadas ao local de administração, ou sistêmicos, que incluem o aumento das exacerbações e as reações anafiláticas, que podem levar à morte do paciente. Desta forma, a imunoterapia alérgeno-específica deve ser indicada apenas quando a exclusão do fator de risco ambiental e a intervenção farmacológica, incluindo glicocorticóides inalados, não funcionarem no controle da asma (*Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2010).

1.3.2.3 Glicocorticóides

Os glicocorticóides são amplamente utilizados no tratamento de diversas doenças inflamatórias. Um dos usos mais comuns dos glicocorticóides é no tratamento da asma, onde a forma farmacêutica inalada tornou-se a terapia de primeira linha e a mais eficaz (BARNES, 2006).

O glicocorticóide livre difunde-se através da membrana celular, e interage com receptores de glicocorticóides (GR) presentes no citoplasma, que são ativados e sofrem uma modificação conformacional, expondo um domínio ligante do DNA. O complexo esteróide - receptor forma dímeros que migram para o núcleo e ligam-se em determinadas regiões do DNA suprimindo a expressão de proteínas pró-inflamatórias (transrepressão) ou ligando-se a regiões que aumentam a expressão de proteínas anti-inflamatórias (transativação). A repressão é obtida através da inibição de diversos fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e AP-1 (HOLGATE e POLOSA, 2008).

Existem duas isoformas dos GR, o GR α e o GR β . Ambos são encontrados praticamente em todos os tecidos, porém apenas o GR α é capaz de se ligar aos glicocorticóides, enquanto o GR β age como inibidor do GR α , impedindo a ligação deste receptor ao DNA (CHIKANZA, KOZACI e CHERNAJOVSKY, 2003). A isoforma GR β está associada no quadro de resistência a esteróide na asma (BARNES, 2006).

O complexo GR - glicocorticóides migra rapidamente para o núcleo, onde liga-se em sequências específicas do DNA na região promotora de genes implicados na asma, denominados elementos responsivos aos glicocorticóides (GRE) (BARNES, 2005). A interação do GR - glicocorticóides com o GRE induz o aumento da transcrição gênica. O GR - glicocorticóides se liga a moléculas co-ativadoras da transcrição como as proteínas ligantes de CREB (CBP) ou pCAF (fator associado ao p300-CBP), os quais têm atividade acetiltransferase de histonas (HAT) intrínseca e causam a acetilação das histonas, principalmente da histona-4. A acetilação das histonas induz o recrutamento de um complexo remodelador de cromatina que permite a ligação de RNA polimerase II e culmina na ativação do gene. Muitos dos genes que são ativados pelos glicocorticóides induzem a produção de proteínas com efeitos anti-inflamatórios, e incluem a anexina-1, inibidor de leucoprotease secretória (SLPI), interleucina-10 e o inibidor do NF- κ B (I κ B- α). Os glicocorticóides também ativam duas proteínas que afetam vias inflamatórias de transdução de sinal, como o GILZ (proteína leucina zíper induzida por corticóide), que inibe o NF- κ B e a AP-1, e a MAP quinase fosfatase-1 (MKP-1), que inibe a p38 MAP quinase (BARNES, 2006).

Além disso, no controle da inflamação, o maior efeito dos glicocorticóides é a inibição de síntese de diversas proteínas inflamatórias através da supressão de genes (BARNES, 2006). O receptor GR interage com moléculas co-repressoras atenuando a atividade de co-ativadores associados ao NF- κ B, culminando assim, na redução da acetilação das histonas, no remodelamento da cromatina e na ação de RNA polimerase II. A redução da acetilação das histonas ocorre através do recrutamento das enzimas histonas desacetilase-2 (HDAC2) para os genes inflamatórios ativados, resultando na supressão destes no núcleo (BARNES, 2006).

Os glicocorticóides são a única terapia que suprime a inflamação nas vias aéreas dos asmáticos, desencadeando a melhora clínica dos sintomas e a prevenção de exacerbações na asma. Ao nível celular, os glicocorticóides reduzem o número de células inflamatórias nas vias aéreas, incluindo eosinófilos, linfócitos T,

mastócitos e células dendríticas. Este efeito é devido à supressão da produção de mediadores quimiotáticos e das moléculas de adesão, além de inibir a sobrevivência destas células inflamatórias nas vias aéreas. Desta forma, os glicocorticóides exercem seus efeitos anti-inflamatórios na asma pela atuação em diversos alvos (BARNES e ADOCK, 2003).

Para o controle dos sintomas da asma grave são requeridas altas doses de glicocorticóides inalados muitas vezes associados ao esquema oral. A utilização de glicocorticóides por via oral leva à ocorrência de efeitos colaterais, que muitas vezes limitam o seu uso. Entre esses efeitos estão a supressão da imunidade, insuficiência supra-renal aguda e deficiência do metabolismo, elevação da pressão intracraniana, hipercoagulabilidade do sangue e distúrbios do ciclo menstrual. Além disso, altas doses de glicocorticóides inalados podem causar osteoporose, catarata e glaucoma (TATTERSFIELD *et al*, 2002).

Além dos efeitos colaterais desencadeados pelo uso prolongado desses anti-inflamatórios, é importante destacar que há uma parcela de pacientes que não respondem ao tratamento com os glicocorticóides sistêmicos ou inalados, independente da dose e do período de tratamento (BARNES e ADOCK, 2003). Alguns mecanismos são sugeridos para explicar a resistência aos glicocorticóides, dentre eles é sugerida a redução da afinidade dos receptores GRs em células inflamatórias, tais como os linfócitos T, por ação de citocinas como IL-2, IL-4 e IL-13. Outro mecanismo é o aumento da ativação do fator de transcrição AP-1 por citocinas inflamatórias, reduzindo a disponibilidade dos receptores GR ativados (BARNES e ADOCK, 2003). Além disso, estudos mostram que no quadro de resistência a glicocorticóides há um aumento da expressão dos receptores GR β (BARNES, 2006).

Assim, tem-se a necessidade de encontrar terapias anti-inflamatórias alternativas para a asma grave, bem como para indivíduos refratários ao tratamento com glicocorticóides.

1.4 Anexina-1 e Peptídeo Ac2-26

Durante a resposta inflamatória, existe um balanço entre as vias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que atuam em conjunto para iniciar, manter e resolver o quadro patológico, garantindo a manutenção da homeostasia. Os mediadores anti-inflamatórios podem atuar em vários estágios da resposta inflamatória, de forma que o bloqueio ou ablação de suas ações produz uma resposta inflamatória de maior intensidade ou com a duração mais prolongada (KAMAL, FLOWER e PERRETTI, 2005). Dentre esses mediadores anti-inflamatórios destacam-se os hormônios corticóides, que exercem efeitos fundamentais para a manutenção da homeostase (COVER *et al.* 2002). Além disso, os glicocorticóides apresentam potente e amplo espectro de ações farmacológicas, e por isso têm sido utilizados amplamente no tratamento de doenças inflamatórias de origem alérgica, como a asma (BARNES e ADOCK, 2003). Estudos mostraram que parte das ações anti-inflamatórias dos glicocorticóides é mediada por uma proteína endógena denominada anexina-1 (KAMAL, FLOWER e PERRETTI, 2005; PERRETTI, 2003).

A anexina-1 foi o primeiro membro da superfamília das anexinas, descrita no final da década de 1970, inicialmente conhecida como macrocortina, renocortina e lipomodulina, então chamada de lipocortina-1 e finalmente de anexina-1 (LIM E PERVAIZ, 2007). Os membros desta superfamília são caracterizados por possuir um domínio altamente conservado, denominado região C-terminal, que contém quatro ou oito repetições de aproximadamente 70 aminoácidos, este domínio confere à proteína a habilidade de se ligar aos fosfolipídios de forma dependente de cálcio. Entretanto a função específica de cada anexina é relacionada com a região N-terminal (JONH *et al.*, 2008).

A anexina-1 é uma proteína endógena que possui 37 kDa, não detectada no plasma, porém é encontrada em muitas células e tecidos, como o pulmão, medula óssea e intestino. O mecanismo de secreção da anexina-1 varia de acordo com o tipo celular. Em macrófagos o sistema transportador ABC (*“ATP-binding cassette transporter”*) é responsável pela secreção da proteína, enquanto que nos neutrófilos a liberação é realizada junto com os grânulos de gelatinase. Além disso, a anexina-1 pode ser translocada para a membrana celular após a fosforilação da serina 27 no resíduo amino terminal em células pituitárias. O processo de translocação também

depende da concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, promovendo uma mudança conformacional da molécula protéica, permitindo que a região N-terminal seja exposta, gerando a forma ativa da anexina-1 (GERKE V, 2005).

Após a sua secreção ou exposição na superfície celular, a anexina-1 pode exercer sua função de modo autócrino, no qual a proteína atua na própria célula de onde é liberada, ou de modo parácrino, atuando em outra célula alvo após a sua secreção. Além disso, esta proteína pode atuar de modo justácrino, o qual corresponde a interação da anexina-1, ligada a membrana celular da célula da qual foi sintetizada, com a célula alvo (PERRETTI e DALLI, 2009).

A anexina-1 possui diversas ações biológicas, atuando na inibição da atividade da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), que tem um papel importante na liberação de ácido araquidônico, produzindo dessa forma inúmeros mediadores inflamatórios lipídicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, a inibição dessa cascata contribui para atividade anti-inflamatória, anti-pirética e anti-hiperalgésica da anexina-1 (FLOWER e ROTHWELL, 1994).

Em resposta a ativação celular, a anexina-1 é mobilizada para a membrana celular e posteriormente liberada, podendo então ligar-se aos receptores formilados (FRP), FRP1 e FRP2, pertencentes a grande família dos receptores acoplados à proteína G, para inibir a adesão e migração celular e induzir o desprendimento de células aderentes. O receptor FPR1 é caracterizado pela alta afinidade pelo peptídeo fMPL (n-formil-metionil-fenilalanina), e está associado com a defesa do hospedeiro, promovendo a migração leucocitária, produção de citocinas e íons superóxido e a degranulação de células fagocíticas. O FPR2 é capaz de interagir com diversos produtos naturais incluindo a lipoxina A_4 (ALXA_4), a anexina-1, proteína soro amilóide (SAA) e peptídeos do HIV. Assim como o FPR1, o receptor FPR2 também está implicado na defesa no organismo, porém apresenta importante papel na via anti-inflamatória (DUFTON e PERRETTI, 2010). Hayhoe (2006) relatou que a proteína anexina-1 possui maior afinidade aos receptores FPR2/ALX.

A anexina-1 também tem sua expressão regulada por glicocorticóides através da sua atuação em receptores GR, o que contribui para a atividade anti-inflamatória desses hormônios. Outra importante ação da anexina-1 é a indução da apoptose, no qual esta proteína é recrutada para a superfície da célula, onde liga-se a fosfatidilserina (PS) passando a atuar como sinal para fagocitose de células em apoptose. Além disso, a anexina-1 pode mediar a apoptose translocando-se para o

núcleo da célula e inibindo o Bcl-2 ou induzindo a desfosforilação do BAD, permitindo que este se transloque para a mitocôndria. Além disso, a anexina-1 pode ser fosforilada por algumas quinases e mediar proliferação celular (LIM e PERVAIZ, 2007). D'Acquisto e colaboradores. (2007) demonstrou que a anexina-1 também é capaz de modular a diferenciação dos linfócitos T, favorecendo a mudança do fenótipo T_h2 para T_h1.

Inúmeros estudos têm enfatizado que o peptídeo derivado da região N-terminal da anexina-1, o Ac2-26, podem reproduzir as ações anti-inflamatórias da proteína inteira em muitos sistemas (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009). Estudos demonstram que o peptídeo Ac2-26 reduz o dano no miocárdio dependente da transmigração de leucócitos associado com o processo isquêmico por reperfusão (LA *et al*, 2001). Além disso, estudos demonstraram que o Ac2-26 ativa tanto o receptor FPR1 como o FPR2, promovendo alteração da migração celular e consequentemente a redução da resposta inflamatória (HAYHOE *et al*, 2006; SOLITO *et al*, 2003). Bandeira-Melo e colaboradores (2005) demonstraram que o Ac2-26 inibiu o extravasamento de proteínas plasmáticas, na geração de eotaxina e no acúmulo de neutrófilos e eosinófilos no pulmão. Esses achados mostraram-se bastante promissores e apontam para o peptídeo Ac2-26 como uma ferramenta terapêutica, alternativa ao uso de glicocorticóides, para aplicação de doenças inflamatórias como a asma.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da proteína endógena anti-inflamatória anexina-1 e do seu derivado peptídico Ac2-26, no modelo experimental de asma alérgica em camundongos.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar o papel da anexina-1 endógena na função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina;
- Avaliar o papel da anexina-1 endógena no infiltrado inflamatório, na produção de muco, na deposição de colágeno e na geração de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina;
- Investigar o efeito do tratamento com o derivado da proteína anexina-1, peptídeo Ac2-26, na função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina;
- Avaliar o efeito do peptídeo Ac2-26 no infiltrado inflamatório, na produção de muco, na deposição de colágeno e na geração de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos (18 – 20 g) depletados para o gene da proteína anexina-1 (AnxA1^{-/-}) e animais selvagens da cepa Balb/c (AnxA1^{+/+}), provenientes do Centro de Criação de Animais (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) sob a licença de nº L-034/09. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura entre 25 e 28 °C, ciclo de luz definido em 12 h de claro e 12 h de escuro e livre acesso à ração e água.

3.2 Modelo de asma alérgica aguda

Para a sensibilização, os animais receberam uma injeção subcutânea, na região dorsal, de uma mistura contendo 50 µg de ovoalbumina em 5 mg de gel de hidróxido de alumínio. Após 14 dias os animais receberam um reforço antigênico, por via intraperitoneal, com a mesma concentração de ovoalbumina e hidróxido de alumínio utilizado na sensibilização. Após 5 dias os animais foram submetidos à anestesia inalatória com halotano (0,5%) (Tonahalo, Cristália, São Paulo) até a completa sedação. Em seguida, foram desafiados com 25 µg/µl de ovoalbumina, por via intranasal, durante 3 dias consecutivos. Animais sensibilizados e desafiados com salina foram utilizados como controles negativos.

3.3 Tratamento com o peptídeo Ac2-26

O tratamento foi realizado em camundongos BALB/c mediante administração do peptídeo Ac2-26 (Cambridge Research Biochemicals, UK) nas doses 50, 100 e 200 µg/animal, por via intranasal, 1 hora antes de cada desafio antigênico. Animais sensibilizados e desafiados com salina foram utilizados como controles negativos.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos que consistiram em: 1) sensibilizados e desafiados com salina; 2) sensibilizados e desafiados com ovoalbumina (OVA), 3) sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e tratados com Ac-2-26 (50 µg/animal); 4) sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e tratados

com Ac-2-26 (100 µg/animal); 5) sensibilizados e desafiados com ovoalbumina e tratados com Ac-2-26 (200 µg/animal).

3.4 Avaliação da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram submetidos à análise da função pulmonar através de um pletismógrafo de corpo inteiro invasivo (Sistema Buxco, UK) permitindo a obtenção dos parâmetros de resistência das vias aéreas (cmH₂O/mL/s) e elastância pulmonar (mL/cmH₂O). Para isso utilizamos seis camundongos por grupo, que após serem anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.) e curarizados com brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/kg), foram traqueostomizados para introdução de uma cânula e posicionados em uma cama aquecida. A cânula traqueal foi conectada a um ventilador respiratório, onde parâmetros como fluxo de ar (200 µL) e volume corrente (2 - 5 mL) foram mantidos constantes. Um cateter foi introduzido por via oral e preenchido com água para captura da pressão esofágica. O pneumotacógrafo acoplado à câmara do pletismógrafo coletou o fluxo respiratório e um transdutor ligado à câmara permitiu que os dados de pressão esofágica e pressão resultante do fluxo fossem transferidos para um computador. Através do *software* BioSystem XA foram processados os sinais de fluxo e pressão, permitindo o registro dos parâmetros de resistência e elastância.

O fenômeno da hiper-reatividade das vias aéreas foi mensurado após a aerolização de concentrações crescentes e cumulativas do agente broncoconstrictor colinérgico metacolina (3 - 81 mg/mL) por um período de 5 minutos para cada concentração.

3.5 Avaliação do perfil de células inflamatórias no lavado broncoalveolar

A caracterização do perfil de celularidade foi obtido através do lavado broncoalveolar. Os camundongos foram traqueostomizados e seus pulmões foram lavados com uma solução de PBS (1x) e EDTA (10 mM) em volume de 1 mL. Os lavados foram, então, submetidos à centrifugação (239 x g por 10 min), o sobrenadante foi recolhido e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 250 µL de PBS + EDTA (10 mM), para as contagens de leucócitos total e diferencial.

Para a análise dos leucócitos totais foi utilizado câmara de Neubauer em sistema de microscopia óptica (objetiva 100x) após a diluição das amostras na solução de Türk (ácido acético 0,2%).

Para a análise diferencial (eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares) foram utilizados citoesfregaços, centrifugados a uma rotação de 14 x g, por 5 min (Incibrás) e posteriormente corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo (objetiva 100x).

3.6 Análise histopatológica

Para avaliação das alterações ao nível tecidual, os camundongos foram eutanasiados com tiopental de sódio (500 mg/Kg, i.p) 24h após o último estímulo antigênico. Os pulmões foram perfundidos por meio de uma cânula intracardíaca com solução de salina e EDTA (10 mM) para a remoção do sangue. O lobo pulmonar direito foi retirado, fragmentado, congelado e mantido a -80°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar e colágeno.

O lobo pulmonar esquerdo foi perfundido com uma solução de paraformaldeído tamponado a 4% e imerso em fixador Milloning (formol tamponado a 10%) durante 24 h. Após fixação, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado com xileno e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos a partir dos blocos de parafina contendo o tecido pulmonar, e submetidos à coloração com Hematoxilina-eosina (H&E) para a análise da estrutura pulmonar, ácido periódico de Schiff (PAS) para analisar a presença de muco e tricrômico de gomori para avaliar a deposição de componentes de matriz extracelular.

Os cortes foram observados em microscópio óptico (Olympus U-TV1X) acoplado a uma câmera (Olympus Q Color 3 – 0044C-194) e captura da imagem feita mediante o uso de um *software* de análise (Q Capture).

3.7 Análise morfométrica no tecido pulmonar

Para a quantificação da secreção de muco pelas células caliciformes nas vias aéreas, foram realizadas secções do tecido pulmonar corados com ácido periódico de Schiff (PAS). Em seguida, os cortes foram observados um microscópio óptico (modelo Olympus U-TV1X) e capturadas através de uma câmera de vídeo (Olympus Q Color 3 – 0044C-194). O processamento das fotomicrografias foi realizado no programa *Image Pro 5* através da quantificação da cor dentro da via aérea selecionada (análise digital).

Para a quantificação do número de eosinófilos encontrados na região peribrônquiolar, foram realizados através de secções de pulmão coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Para isso, foi utilizado retículo morfométrico quadrado acoplado na ocular do microscópio de óptico (modelo Olympus BX50). O retículo foi posicionado na região peribrônquiolar das vias aéreas periféricas e foram contados na objetiva de imersão a óleo, os eosinófilos presentes nos quadrantes do retículo.

3.8 Quantificação de colágeno no tecido pulmonar

A análise quantitativa de colágeno no tecido pulmonar foi realizada através da técnica colorimétrica de Sircol (Kit Biocolor, UK). Os pulmões foram macerados em solução de Tris (0,05 M) e NaCl (1 M). O material foi centrifugado a 15.000 x g por 1 h a 4°C. Foram recolhidos 20 µl do sobrenadante e a esta foi adicionado o reagente de Sircol. As amostras ficaram 30 min no vórtex, em seguidas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado o reagente Alkaline. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços de fundo chato e a absorbância determinada no comprimento de onda de 540 nm. O resultado foi expresso como µg de colágeno/pulmão direito.

3.9 Quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA

Os pulmões dos camundongos foram macerados em PBS 1x contendo inibidor de protease (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel Suíça) e mantidos a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 2019 x g por 15 min e o sobrenadante separado para posterior análise. Em placa de 96 poços de fundo chato, foi adicionado o

anticorpo capturador diluído em tampão (NaCl 1,5 M, H₃BO₄ 0,5 M e NaOH 1 N) durante 12 h à 4°C. Em seguida, os poços foram lavados com tampão 1 (timerosal, KPO₄ 1M e *Tween* 20 0,005%). Posteriormente, foi adicionada à placa solução contendo PBS/BSA 1% (albumina bovina sérica) para o bloqueio de sítios inespecíficos. As placas foram novamente lavadas com o tampão 1 e, em seguida, foram adicionadas as amostras e os padrões diluídos em tampão 2 (2% de soro fetal bovino). Após o período de incubação (2h a 37°C), foram realizadas novas lavagens com o tampão 1. Em seguida, foi adicionado o anticorpo detector biotilado (1 h a 20°C). Os poços foram novamente lavados e incubados com uma mistura de neutrovidina-*horseradish peroxidase* (HRP) diluída no tampão 2. Então foi realizada a última lavagem e feita adição do substrato *K-blue*, para a revelação. A reação foi finalizada com ácido sulfúrico e a leitura realizada em espectrofotômetro (450 nm).

3.10 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não pareadas. Para ambos os testes, os valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do papel da proteína anexina-1 (AnxA1) na inflamação alérgica pulmonar

4.1.1 Função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos Anx-1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente

Verificamos que os camundongos AnxA1^{+/+} sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento no nível basal de resistência pulmonar quando comparados ao grupo selvagem sadio. Esta resposta foi mais expressiva após a aerolização de metacolina, mostrando que os animais sensibilizados e desafiados possuem uma maior reatividade das vias aéreas. Considerando os camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizados e instilados com salina, observamos um aumento no nível basal de resistência pulmonar quando comparados com os camundongos selvagens. Após estimulação com a metacolina essa resposta foi ainda mais expressiva mantendo-se semelhante ao grupo AnxA1^{+/+} sensibilizado e desafiado com OVA (Figura 4A).

Ao analisar a elastância pulmonar, observamos que os camundongos AnxA1^{+/+} sensibilizados e desafiados com OVA não apresentaram diferença estatística no nível basal de elastância em comparação aos camundongos selvagens sadios. Porém, após a aerolização com metacolina, os animais apresentaram um aumento nos níveis de elastância pulmonar (Figura 4B). Ao avaliar os camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizados e instilados com salina, observamos um aumento significativo nos níveis de elastância pulmonar após a estimulação com a metacolina quando comparados com os camundongos selvagens sadios. Os camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento expressivo nos níveis elastância pulmonar frente à estimulação com as menores concentrações de metacolina (3 e 9 mg/ml) quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+}.

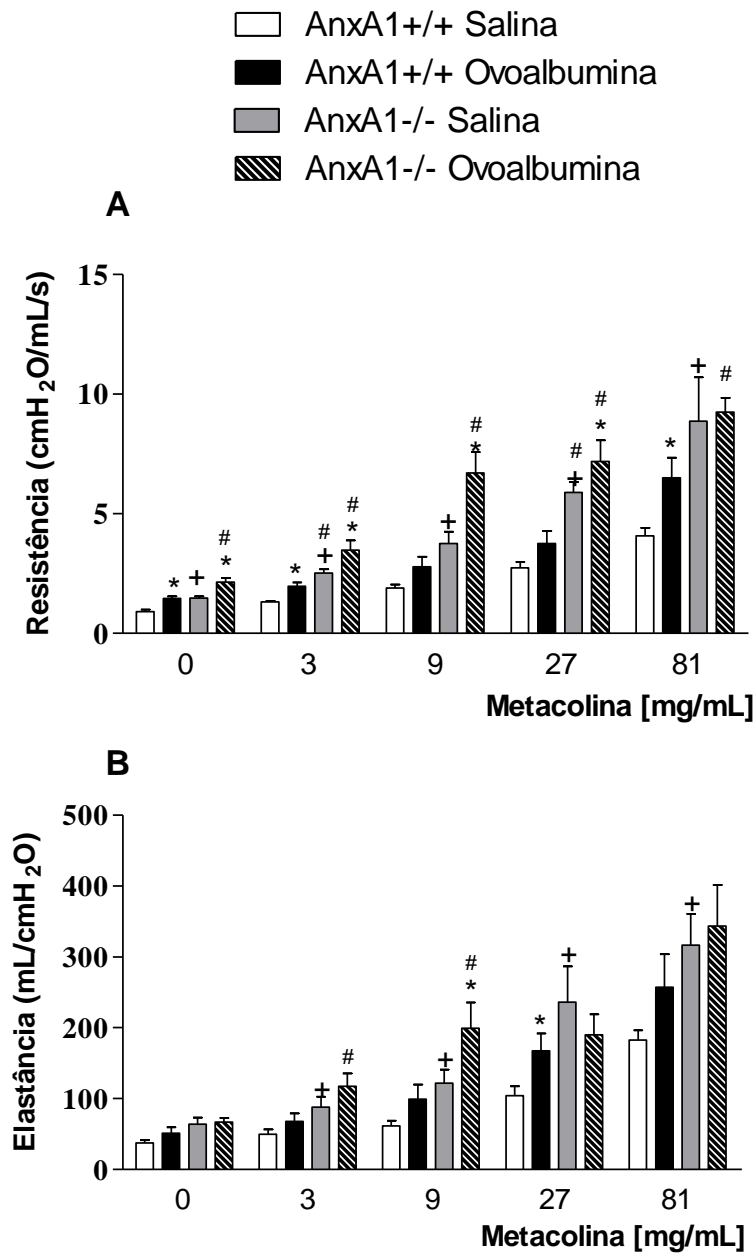


Figura 5. Análise da função pulmonar de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. As análises de resistência (A) e elastância (B) foram realizadas 24 h após o último desafio. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média de um *n* experimental de 6 a 7 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo salina; † indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} salina; # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} ovoalbumina. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

4.1.2 Infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente

Para todos os tipos celulares analisados, os grupos sensibilizados e instilados com salina apresentaram menor número de células quando comparados aos grupos sensibilizados e desafiados com OVA (Figura 5A, B, C e D). O grupo AnxA1^{-/-} sensibilizado e instilado com salina apresentou aumento somente no infiltrado eosinofílico quando comparado com o grupo selvagem sensibilizado e instilado com salina. Em adição, o grupo AnxA1^{-/-} sensibilizado e desafiado com OVA apresentou exacerbação do infiltrado eosinofílico quando comparado com o grupo AnxA1^{+/+} sensibilizado e desafiado com OVA (Figura 5D). O quantitativo basal de leucócitos totais (Figura 5A) incluindo células mononucleares (Figura 5B) e neutrófilos (Figura 5C) não apresentou-se diferente quando comparados os grupos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-}. Percebeu-se, entretanto, uma tendência de elevação na população de leucócitos no BAL nos animais nocautes para anexina-1. Estes achados sugerem um possível papel para anexina-1 na regulação da população leucocitária pulmonar.

4.1.3 Alterações morfológicas no pulmão de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente

Observamos que os camundongos que foram sensibilizados e instilados com salina apresentaram a arquitetura do parênquima pulmonar preservada, com septos alveolares definidos e sem espessamento e vias aéreas sem alterações morfológicas (Figura 6A e C). Ao avaliar os camundongos que foram sensibilizados e desafiados com OVA observamos espessamento das vias aéreas, com presença de intenso infiltrado celular no parênquima (Figura 6B e D).

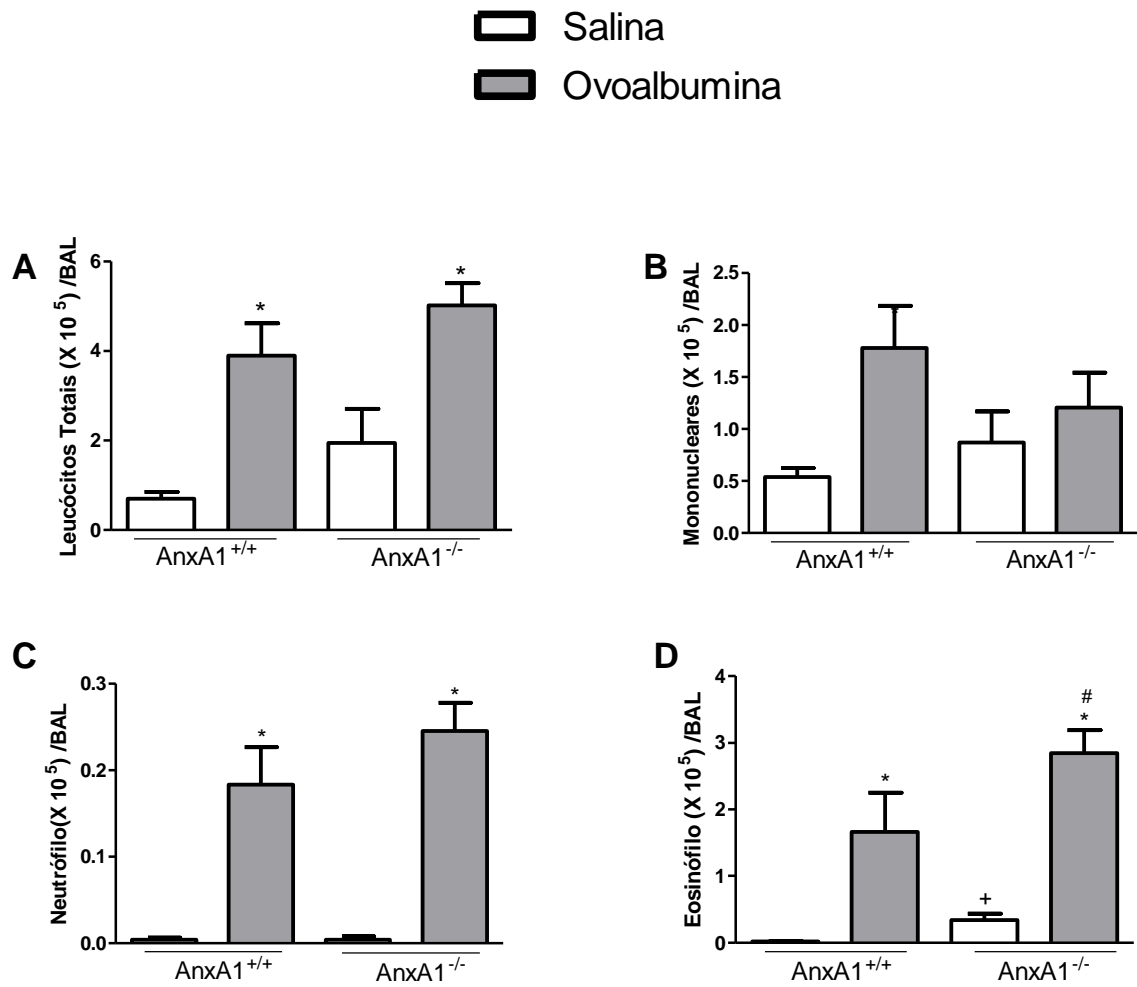


Figura 6. Análise do infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Foi realizada quantificação do número de leucócitos totais (A) e diferencial incluindo células mononucleares (B), neutrófilos (C) e eosinófilos (D). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média de um *n* experimental de 4 a 5 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo salina; + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} salina; # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} ovoalbumina. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

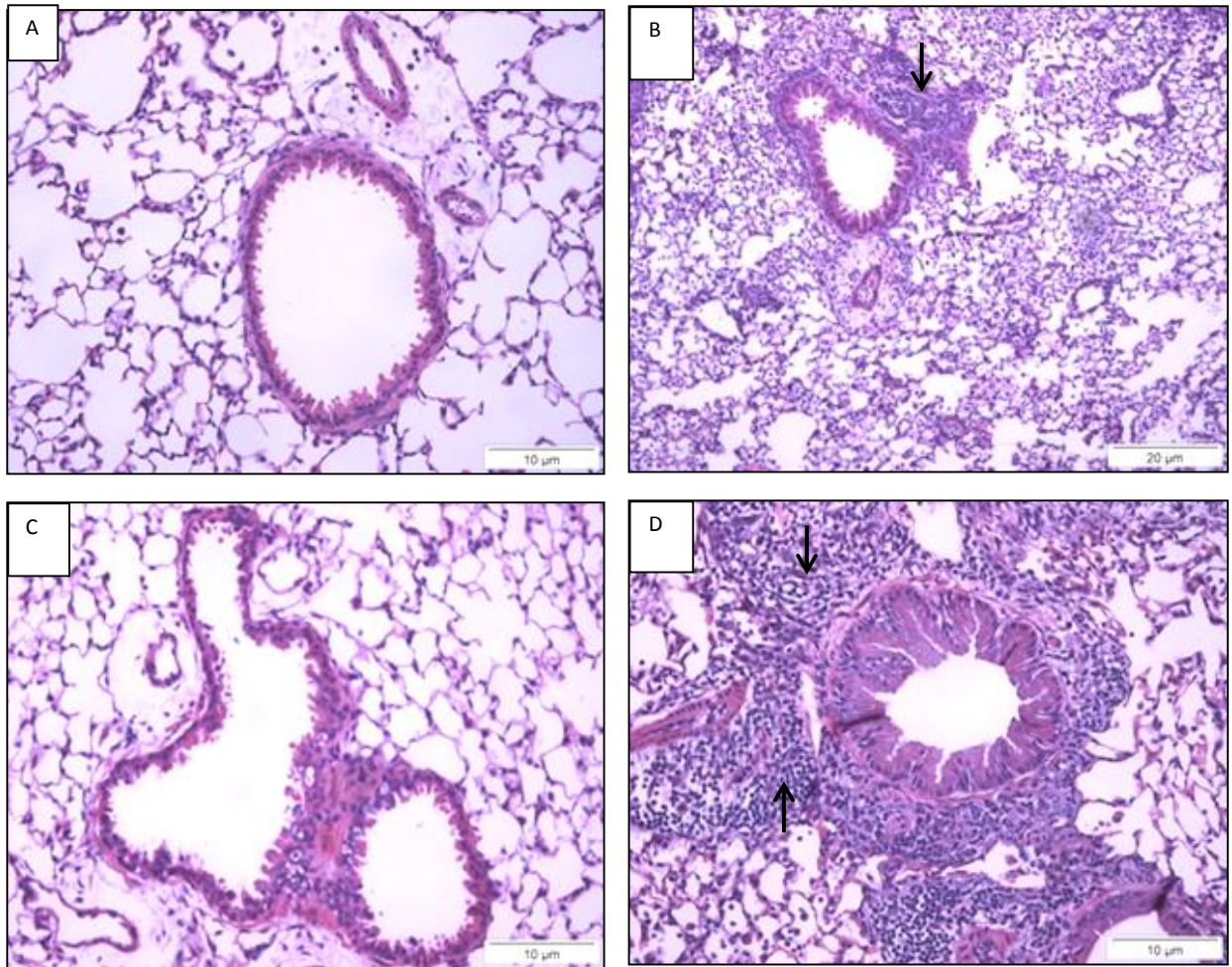


Figura 7. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Estão representados cortes de pulmão corados com HE (aumento de 200x) de camundongos AnxA1^{+/+} sensibilizado e instilado com salina (A) e ovoalbumina (B) e de camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizado e instilado com salina (C) e ovoalbumina (D). A seta indica a presença de infiltrado leucocitário peribrônquiolar.

4.1.4 Infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente

Como pode ser verificado na Figura 7A, não foi observada presença de eosinófilos no tecido pulmonar dos animais AnxA1^{+/+} na condição de instilação com salina, enquanto que aqueles sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um marcado infiltrado eosinofílico predominantemente localizado na região peribrônquiolar (Figura 7B). Observamos que, assim como verificado nos animais selvagens, o grupo AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram uma exacerbação da resposta recrutamento eosinofílico (Figura 7D). A análise quantitativa confirmou os achados acima mencionados (Figura 7E). Essa resposta evidencia que a ausência da anexina-1 permite a ocorrência de um maior infiltrado celular, sendo os eosinófilos as células predominantes.

4.1.5 Deposição de matriz extracelular de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antigenicamente

Com base na utilização do corante Tricômico de Gomori, marcador para componentes de matriz extracelular, verificamos que os grupos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e instilados com salina (Figura 8A e 8C, respectivamente) apresentaram uma marcação basal normal na região peribrônquiolar, compatível com a presença da membrana basal de vasos sanguíneos e das vias aéreas, assim como do tecido conjuntivo do parênquima pulmonar. Os grupos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} que receberam um estímulo antigênico (Figura 8B e 8D, respectivamente) mostraram densa deposição de componentes de matriz na região peribrônquiolar.

Além disso, quantificamos a produção de colágeno no tecido pulmonar através da técnica colorimétrica de Sircol. Observamos que os grupos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento da produção do colágeno no tecido pulmonar quando comparados com o grupo sensibilizado e instilado com salina (Figura 9). A ausência da proteína anexina-1 levou uma exacerbação na deposição de fibras colágenas, reforçando dados anteriores indicativos do papel regulatório da anexina-1.

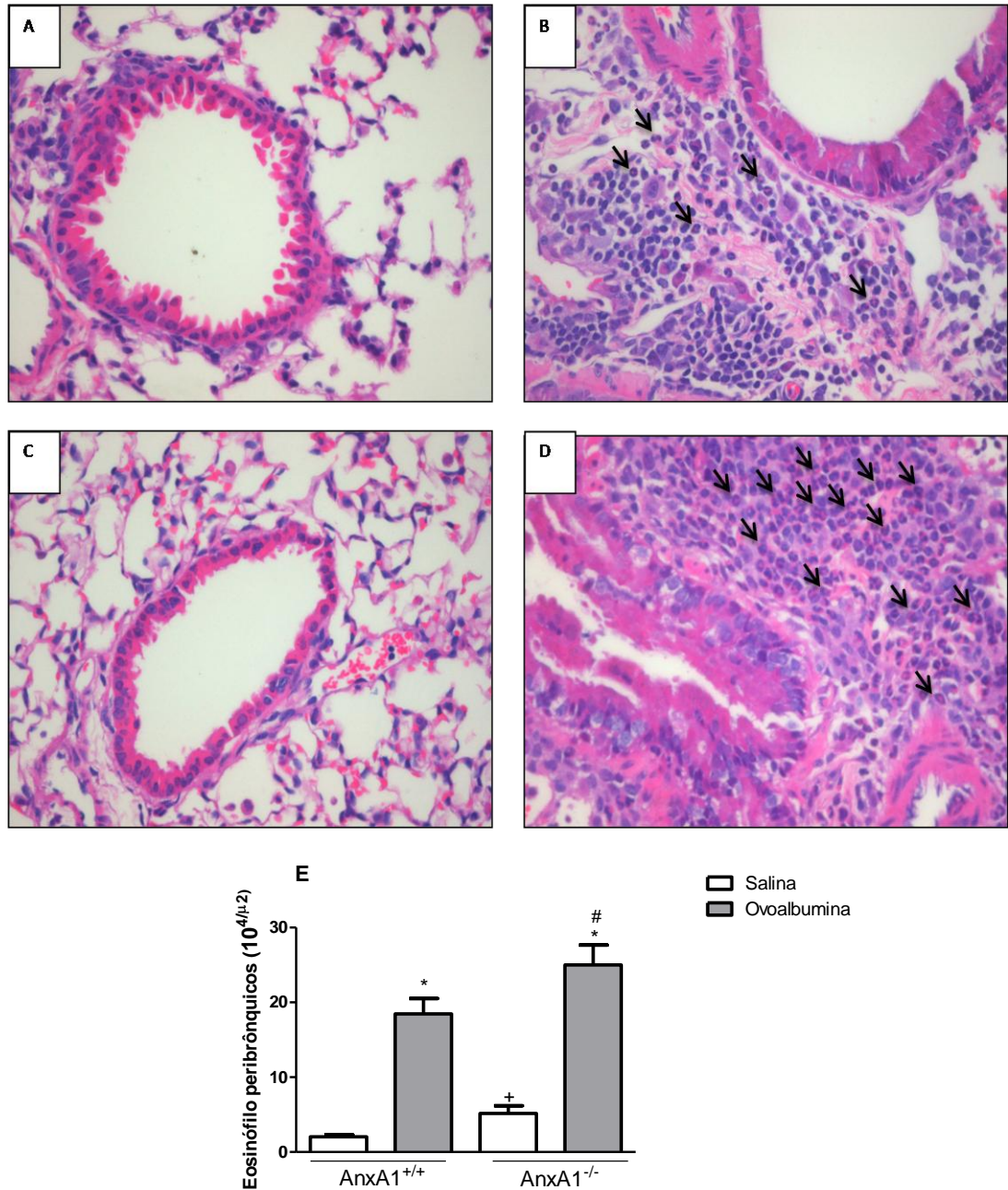


Figura 8. Infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Estão representados cortes de pulmão corados com HE (aumento de 400x) de camundongos AnxA1^{+/+} sensibilizado e instilado com salina (A) e ovoalbumina (B) e de camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizado e instilado com salina (C) e ovoalbumina (D). (E) quantificação de eosinófilo peribrônquico realizado no aumento 1000x. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média de um n experimental de 7 animais por grupo. O * p < 0,05 quando comparado ao respectivo grupo salina; + p < 0,05 quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} salina; # p < 0,05 quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} ovoalbumina. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls. A seta indica o infiltrado de eosinófilo na região peribrônquiolar.

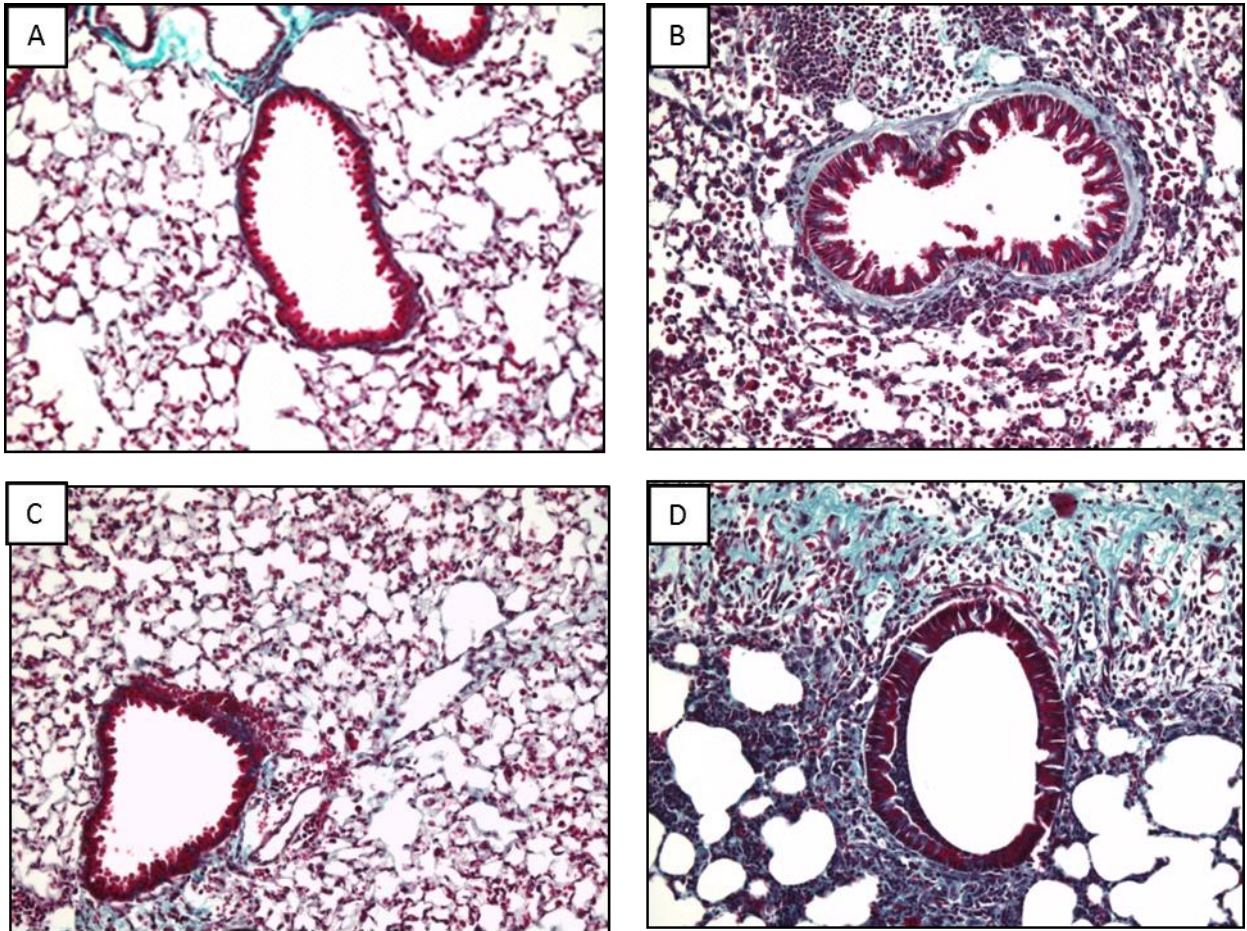


Figura 9. Avaliação da deposição de componentes de matriz extracelular na região peribrônquiolar do pulmão de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Estão representados cortes de pulmão corados com Tricrômico de Gomori (aumento de 200x) de camundongos AnxA1^{+/+} sensibilizado e instilado com salina (A) e ovoalbumina (B) e de camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizado e instilado com salina (C) e ovoalbumina (D).

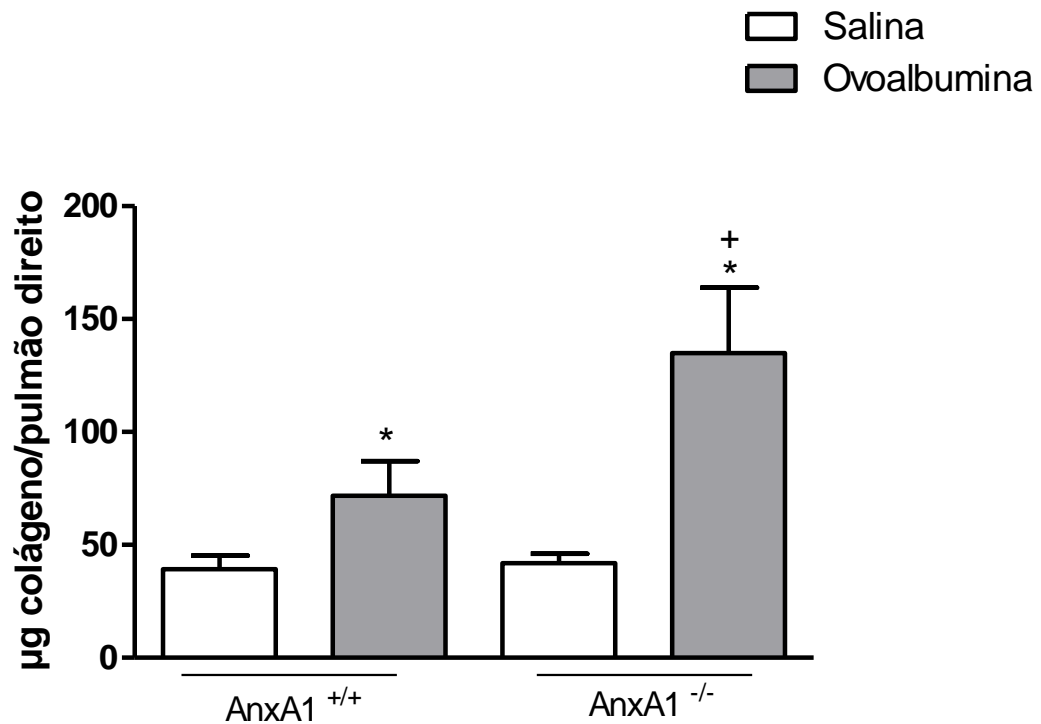


Figura 10. Quantificação do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina através da técnica de Sircol. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média de um n experimental de 9 a 12 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo salina; O + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} ovoalbumina. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

4.1.6 Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antígenicamente

Verificamos que os níveis das citocinas IL-4 e IL-13 (Figura 10A e 10B, respectivamente) e da quimiocina eotaxina-1 (Figura 10C) mostraram-se elevados no pulmão dos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Na ausência de anexina-1, foi possível observar que os níveis IL-13, porém não os de IL-4 e de eotaxina-1 apresentaram-se exacerbados nos camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com OVA em comparação com os animais selvagens. Considerando-se a atividade pró-inflamatória e pró-fibrótica da IL-13, poderia especular que a exacerbação do quadro inflamatório e de remodelamento verificado na condição dos animais AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com OVA poderia estar associado a este fenômeno.

4.1.7 Quantificação da produção de muco nas vias aéreas de camundongos AnxA1^{-/-} e AnxA1^{+/+} provocados antígenicamente

Desta forma, realizamos a quantificação do muco através de análise digital e coloração do tecido com ácido periódico de Schiff (PAS). Vimos que os grupos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com OVA, apresentaram aumento expressivo na produção de muco na via aérea central (Figura 11C e 11D, respectivamente), sem que diferença significativa quantitativa tenha sido verificada entre os grupos (Figura 12).

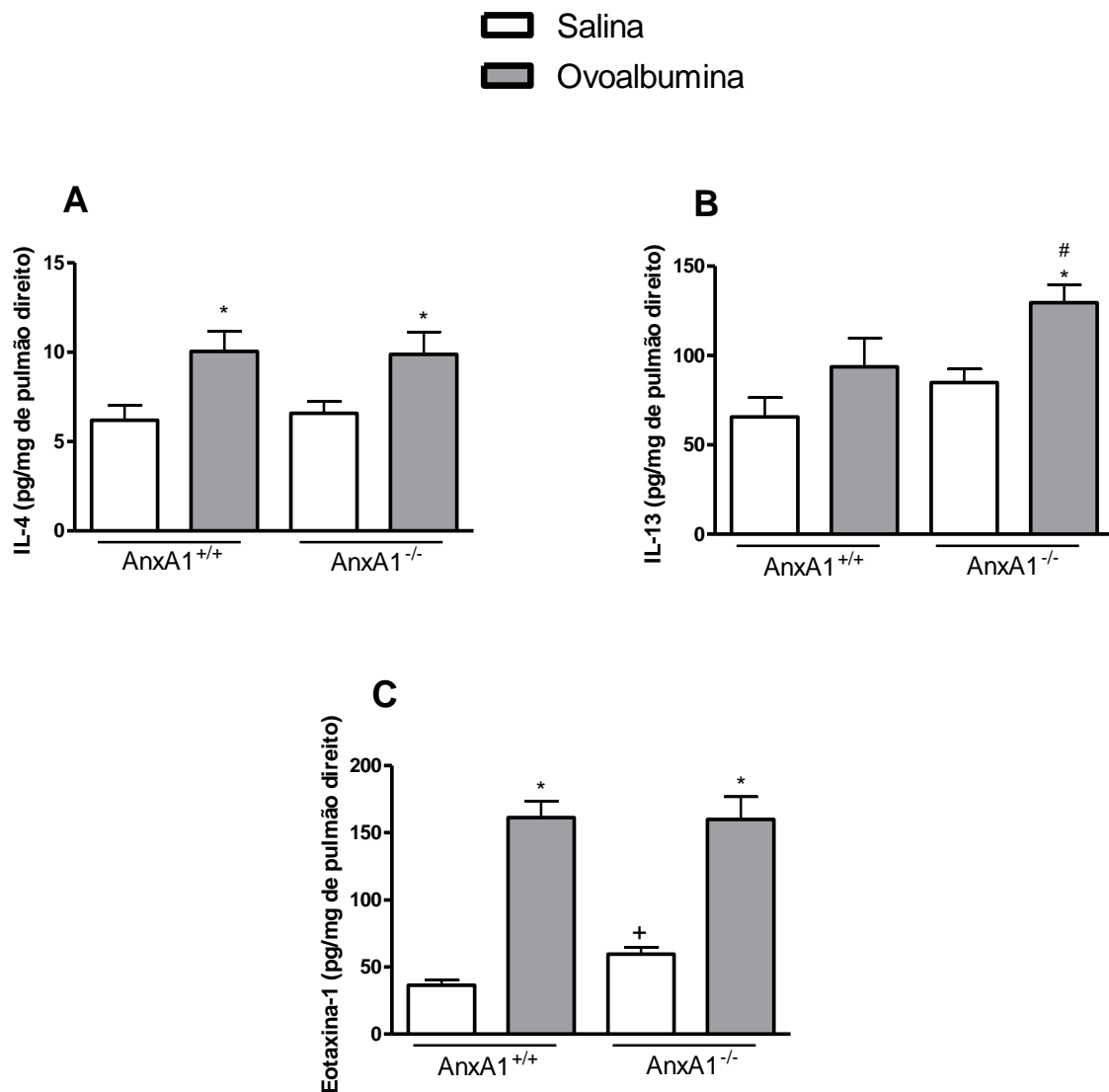


Figura 11. Quantificação de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{+/+} AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Foram quantificadas as citocinas IL-4 (A) e IL-13 (B) e a quimiocinas eotaxina-1 (C). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média de um n experimental de 8 animais por grupo. O * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo salina; + $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} salina e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AnxA1^{+/+} ovoalbumina. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

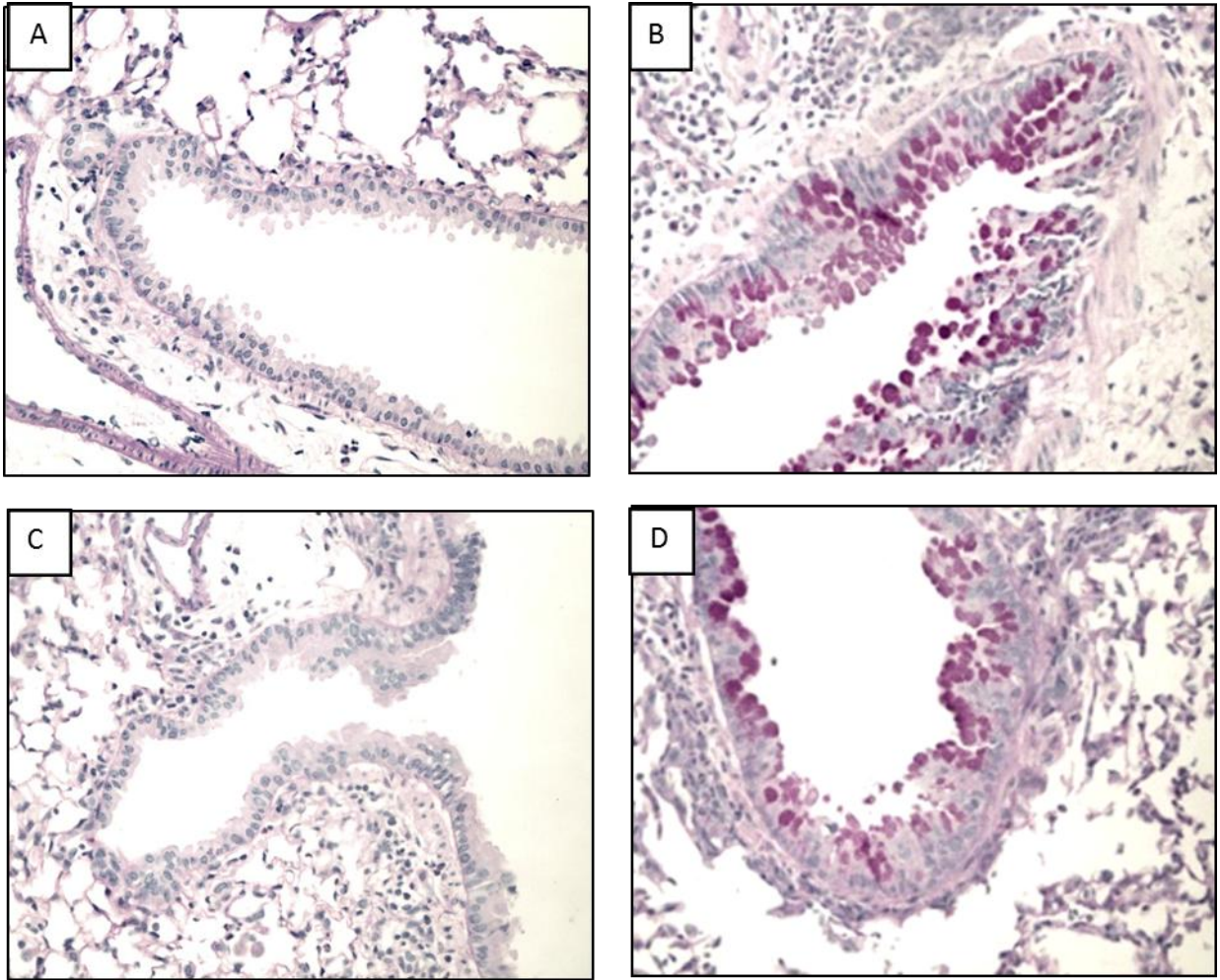


Figura 12. Análise da produção de muco no pulmão de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Estão representados cortes de pulmão corados com PAS (aumento de 200x) de camundongos AnxA1^{+/+} sensibilizado e instilado com salina (A) e ovoalbumina (B), e de camundongos AnxA1^{-/-} sensibilizados e instilados com salina (C) e ovoalbumina (D).

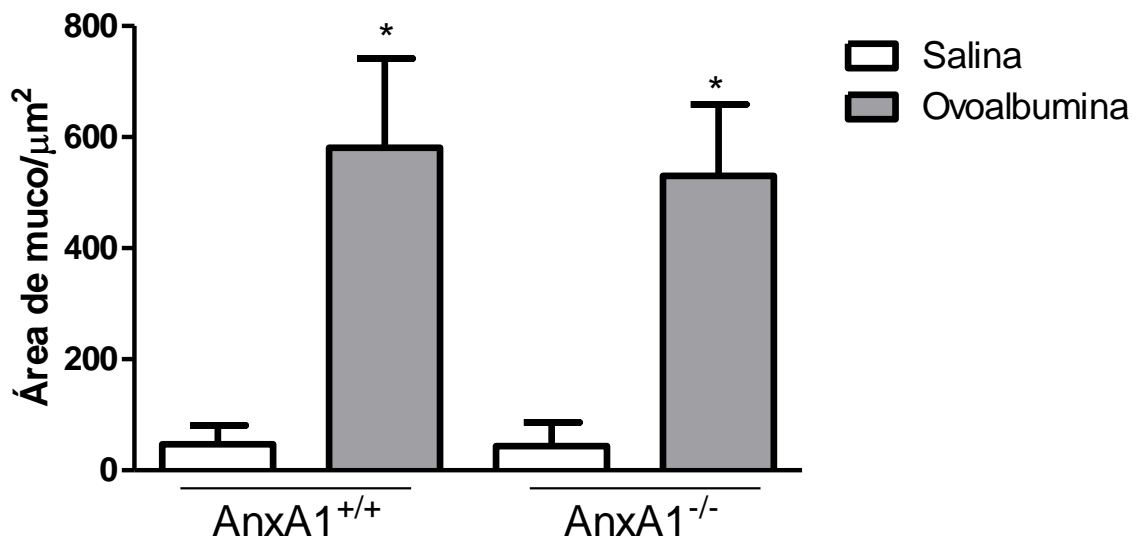


Figura 13. Análise quantitativa da produção de muco no tecido pulmonar de camundongos AnxA1^{+/+} e AnxA1^{-/-} sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média de um n experimental de 4 a 5 animais por grupo. O * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo salina. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

4.2 Efeito do peptídeo Ac2-26 sobre a resposta inflamatória induzida por antígeno em camundongos da cepa BALB/c

4.2.1 Análise da função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos provocados por antígeno

Inicialmente analisamos a função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina (OVA), quando verificamos que estes animais apresentaram um aumento no nível basal de resistência pulmonar quando comparados ao grupo selvagem controle. Quando submetidos à aerolização com concentrações crescentes de metacolina essa resposta foi ainda mais expressiva. Na condição de tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal), não observamos melhora no nível basal de resistência. Entretanto, a maior dose de peptídeo foi capaz de diminuir a hiper-reatividade das vias aéreas nas maiores concentrações utilizadas de metacolina (figura 13A).

Ao analisarmos a elastância pulmonar, observamos que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA não apresentaram diferença estatística no nível basal de elastância em comparação aos camundongos selvagens sadios. Porém, após a aerolização com metacolina, os animais apresentaram um aumento nos níveis de elastância pulmonar (Figura 13B). As maiores doses do peptídeo Ac2-26 (100 e 200 µg/animal) foram capazes de reduzir a resposta produzida nas maiores concentrações de metacolina (9 e 27 mg/ml).

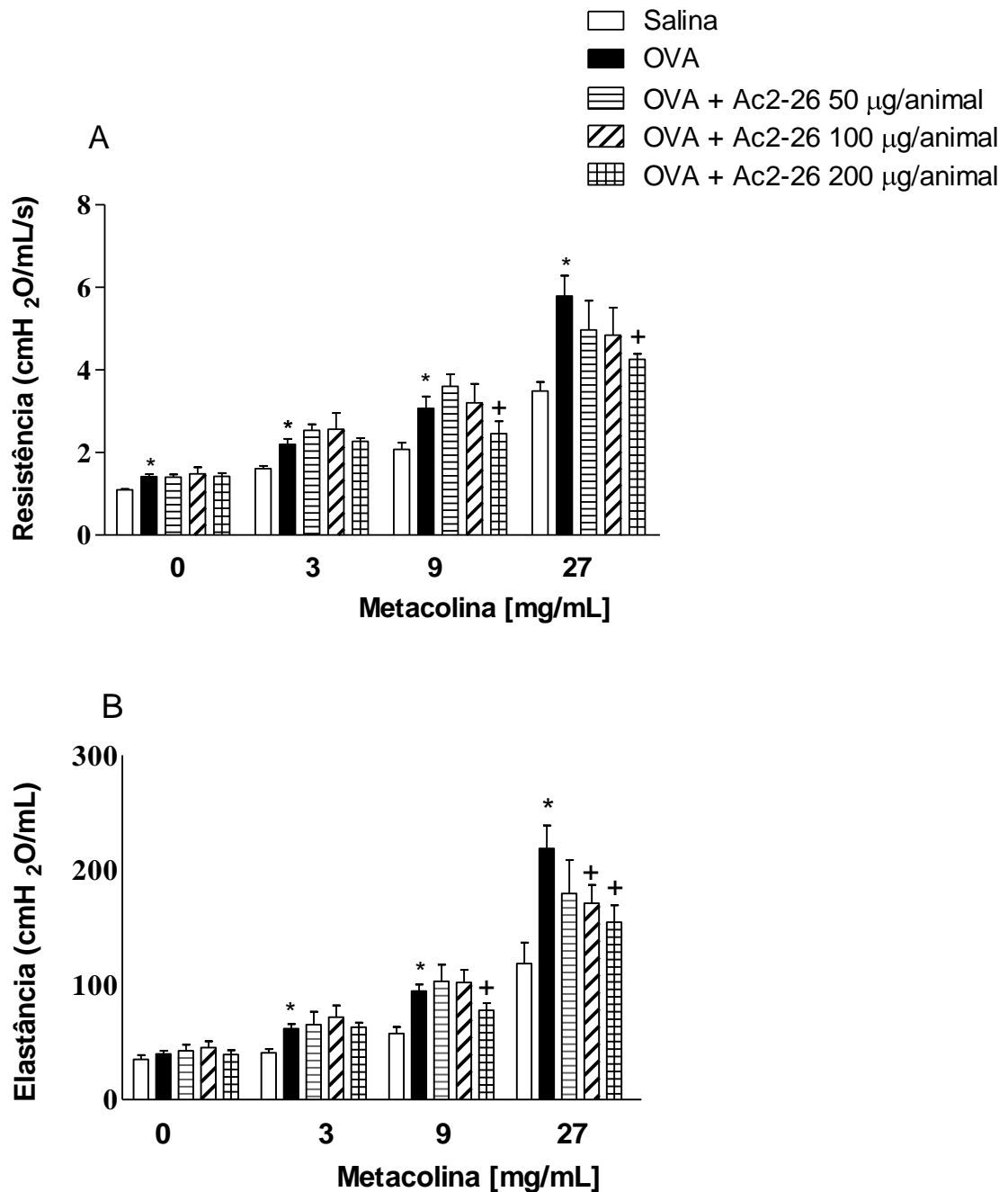


Figura 14. Análise da função pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal). As análises de resistência (A) e elastância (B) foram realizadas 24 h após o último desafio. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média de um n experimental de 6 a 7 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina; + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

4.2.2 Análise do infiltrado inflamatório pulmonar em camundongos provocados antigenicamente

A análise morfológica dos pulmões dos camundongos sensibilizados e instilados com salina revelou que o parênquima apresentou uma arquitetura preservada, septos alveolares bem definidos e ausência de infiltrado inflamatório (Figura 14A). Ao avaliarmos os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, verificamos a presença de um intenso infiltrado inflamatório e espessamento das vias aéreas (Figura 14B). Na condição de tratamento com o peptídeo Ac2-26, notamos uma importante redução do infiltrado inflamatório (Figura 14C, 14D e 14E).

Em adição, realizamos análise mais específica do infiltrado eosinofílico presente na região peribrônquilar. Verificamos que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento expressivo no número de eosinófilos (Figura 15B) quando comparamos com os camundongos sensibilizados e instilados com salina (Figura 15A), e que o tratamento com o peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir o infiltrado eosinofílico nas doses de 50 µg/animal (Figura 15C), 100 µg/animal (Figura 15 D) e 200 µg/animal (Figura 15E). A análise quantitativa confirmou as observações acima (Figura 15F).

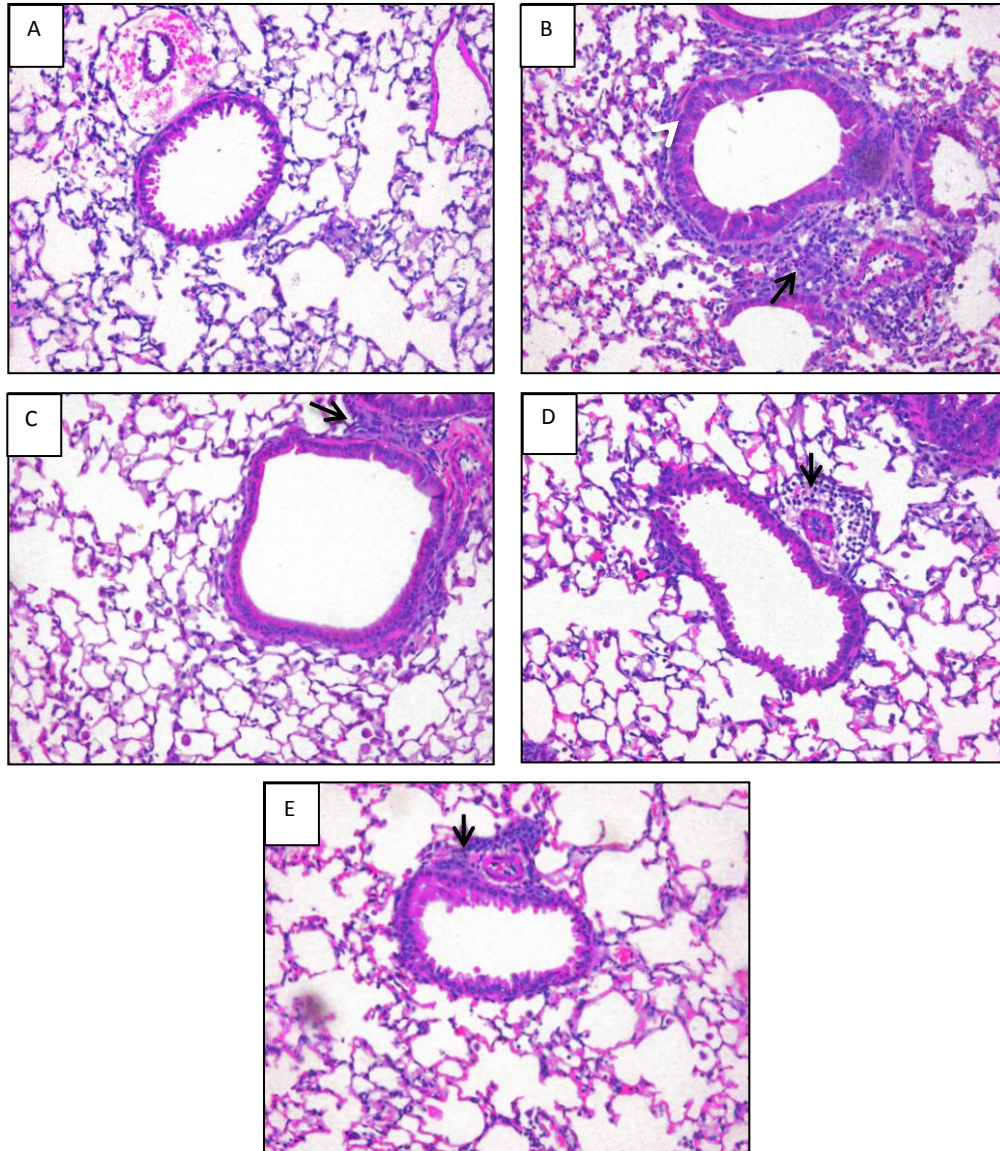


Figura 15. Análise histológica do tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com peptídeo Ac2-26 (50 - 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$). Estão representados cortes de pulmão corados com HE (aumento de 200x) de camundongos sensibilizados e instilados com salina (A) e OVA (B) e de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com Ac2-26 50 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (C) 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (D) e 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (E). A seta indica a presença de infiltrado inflamatório.

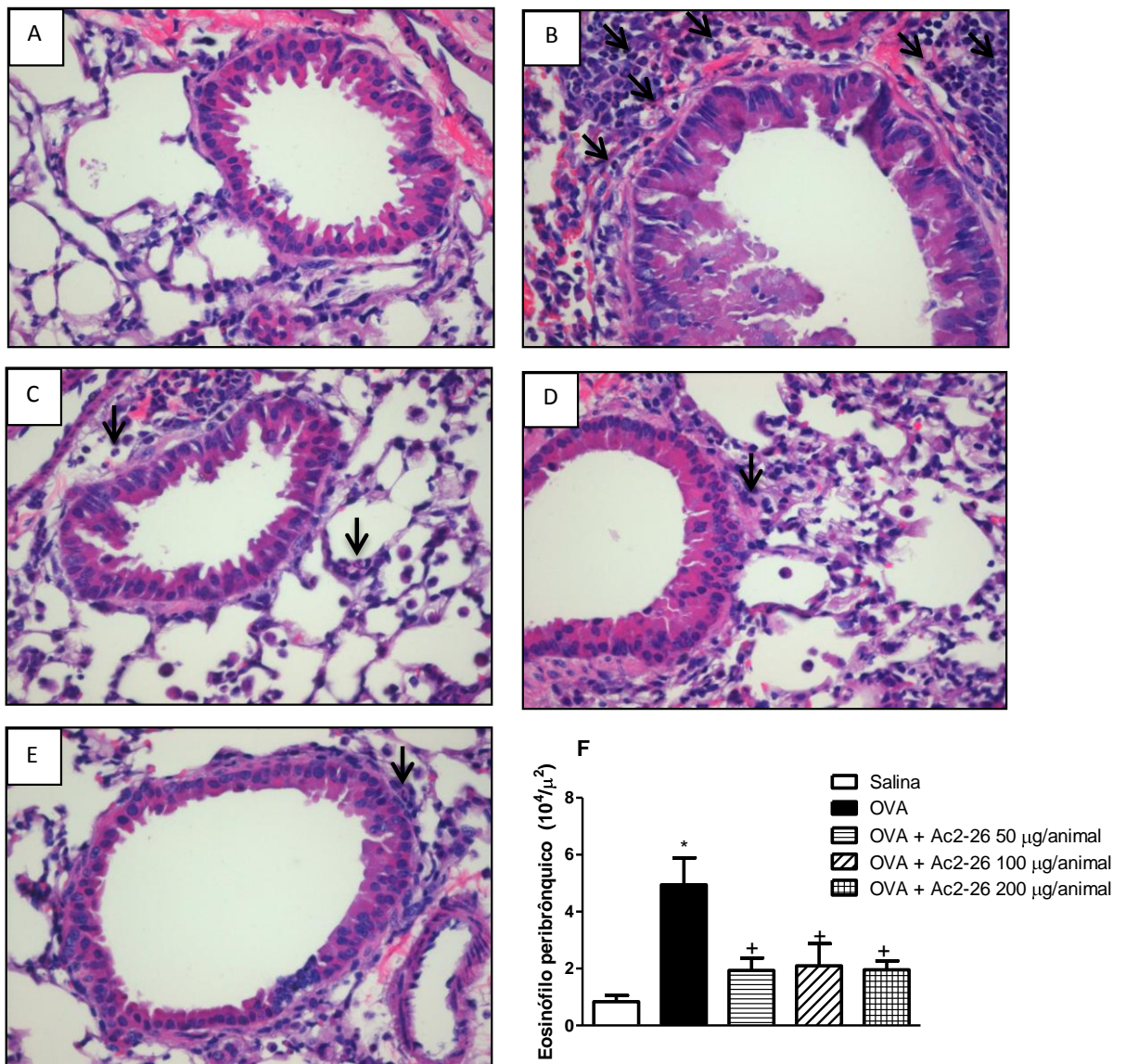


Figura 16. Infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar em camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal). Estão representados cortes de pulmão corados com HE (aumento de 400x) de camundongos sensibilizados e instilados com salina (A) e OVA (B) e tratados com Ac2-26 50 µg/animal (C) 100 µg/animal (D) e 200 µg/animal (E). (F) quantificação de eosinófilo peribrônquico. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média de um n experimental de 5 animais por grupo. O * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina; † $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls. A seta indica o infiltrado de eosinófilo na região peribrônquilar.

4.2.3 Deposição de matriz extracelular no tecido pulmonar de camundongos provocados antigenicamente

Verificamos que os camundongos que receberam um estímulo antigênico apresentaram uma densa deposição de componentes de matriz na região peribrônquiolar. (Figura 16 B). O tratamento com o peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir a deposição de componentes de matriz na região peribrônquiolar.

Além disso, realizamos a quantificação do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar através da técnica colorimétrica de Sircol. Observamos que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento da produção do colágeno no tecido pulmonar, e o peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir a deposição de colágeno no tecido pulmonar (Figura 17).

4.2.4 Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos provocados antigenicamente

Observamos que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram níveis elevados das citocinas IL-4 e IL-13 e das quimiocinas eotaxina-1 e 2 no tecido pulmonar, quando comparados com os camundongos sensibilizados e instilados com salina. Na condição de tratamento com o peptídeo Ac2-26 observamos uma redução significativa nos níveis de IL-4, IL-13, eotaxina-1 e eotaxina-2 (Figura 18).

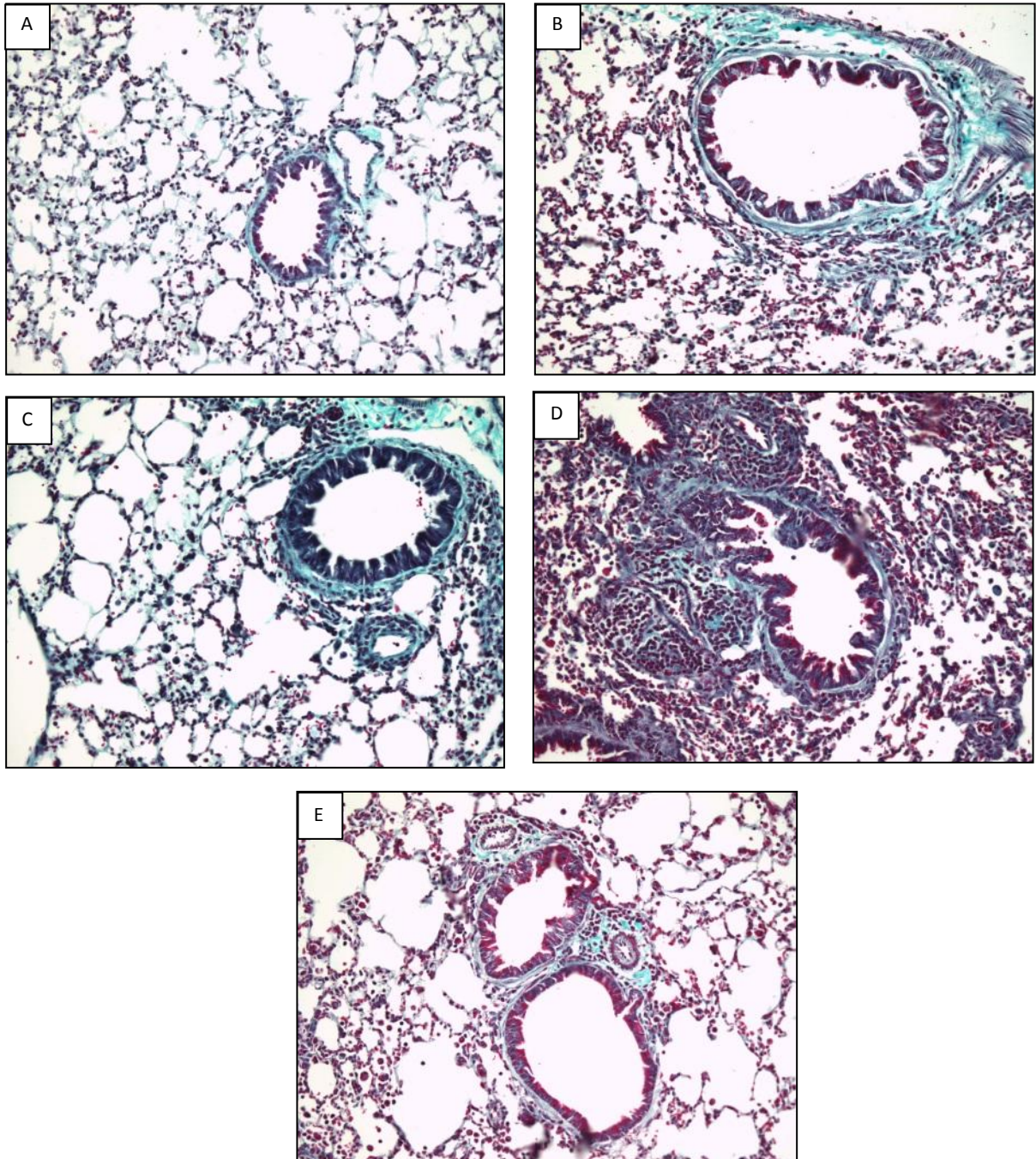


Figura 17. Avaliação da deposição de componentes de matriz extracelular na região peribrônquiolar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 -200 µg/animal). Estão representados cortes de pulmão corados com Tricrômico de Gomori (aumento de 200x) de camundongos sensibilizado e instilado com salina (A) e OVA (B) e de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com Ac2-26 50 µg/animal (C) 100 µg/animal (D) e 200 µg/animal (E).

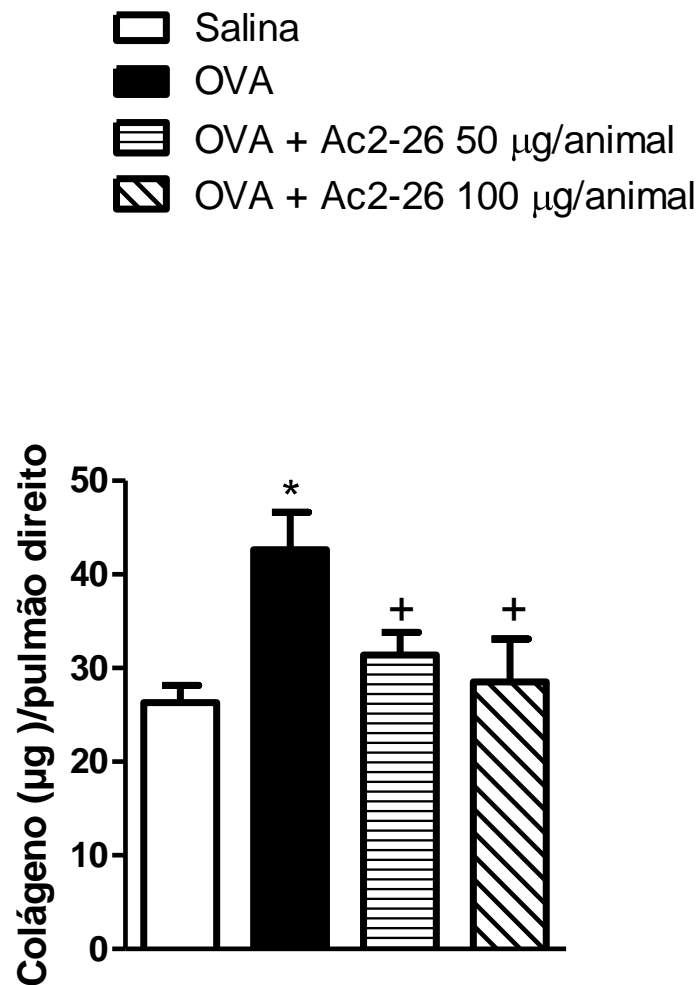


Figura 18. Quantificação do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 100 µg/animal) por técnica de Sircol. Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média de um n experimental de 8 a 10 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina; o + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

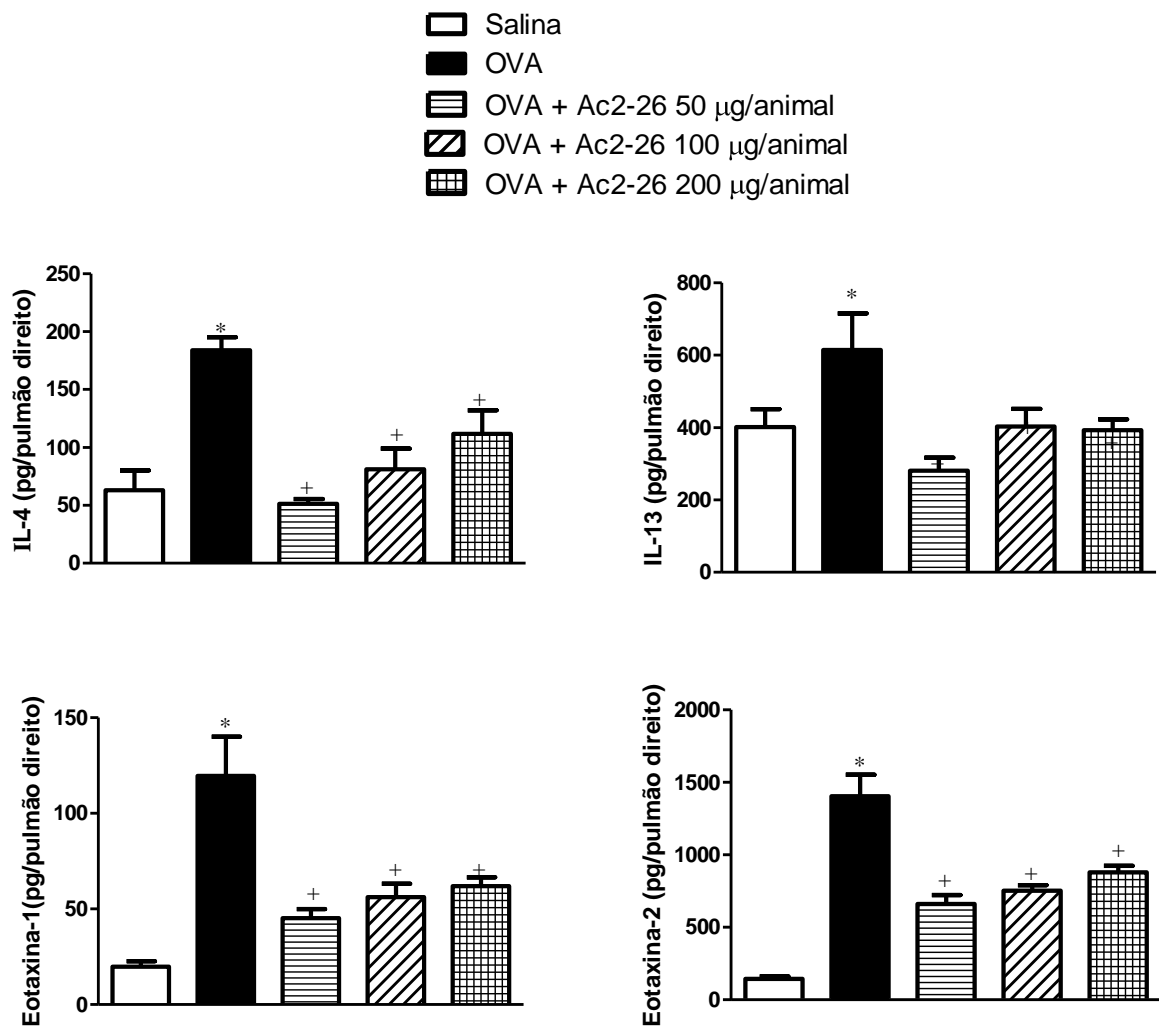


Figura 19. Quantificação de mediadores inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal) por técnica de ELISA. Os valores estão representados como média ± erro padrão da média de um n experimental de 6 a 8 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina; O + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

4.2.5 Quantificação da produção de muco nas vias aéreas de camundongos provocados antigenicamente

Inicialmente notamos cortes histológicos corados com PAS, de forma qualitativa, e verificamos que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram uma hipersecreção de muco nas vias aéreas em comparação com os camundongos controles (Figura 19B e 19A, respectivamente). O tratamento com o peptídeo Ac2-26 foi capaz de reverter este quadro (Figura 19C, 19D e 19E).

De forma a confirmar os achados acima descritos, realizamos uma análise morfométrica. Verificamos que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram um aumento na produção de muco nas vias aéreas (figura 20). Na condição de tratamento, as três doses testadas do peptídeo Ac2-26 foram capazes de inibir a produção de muco.

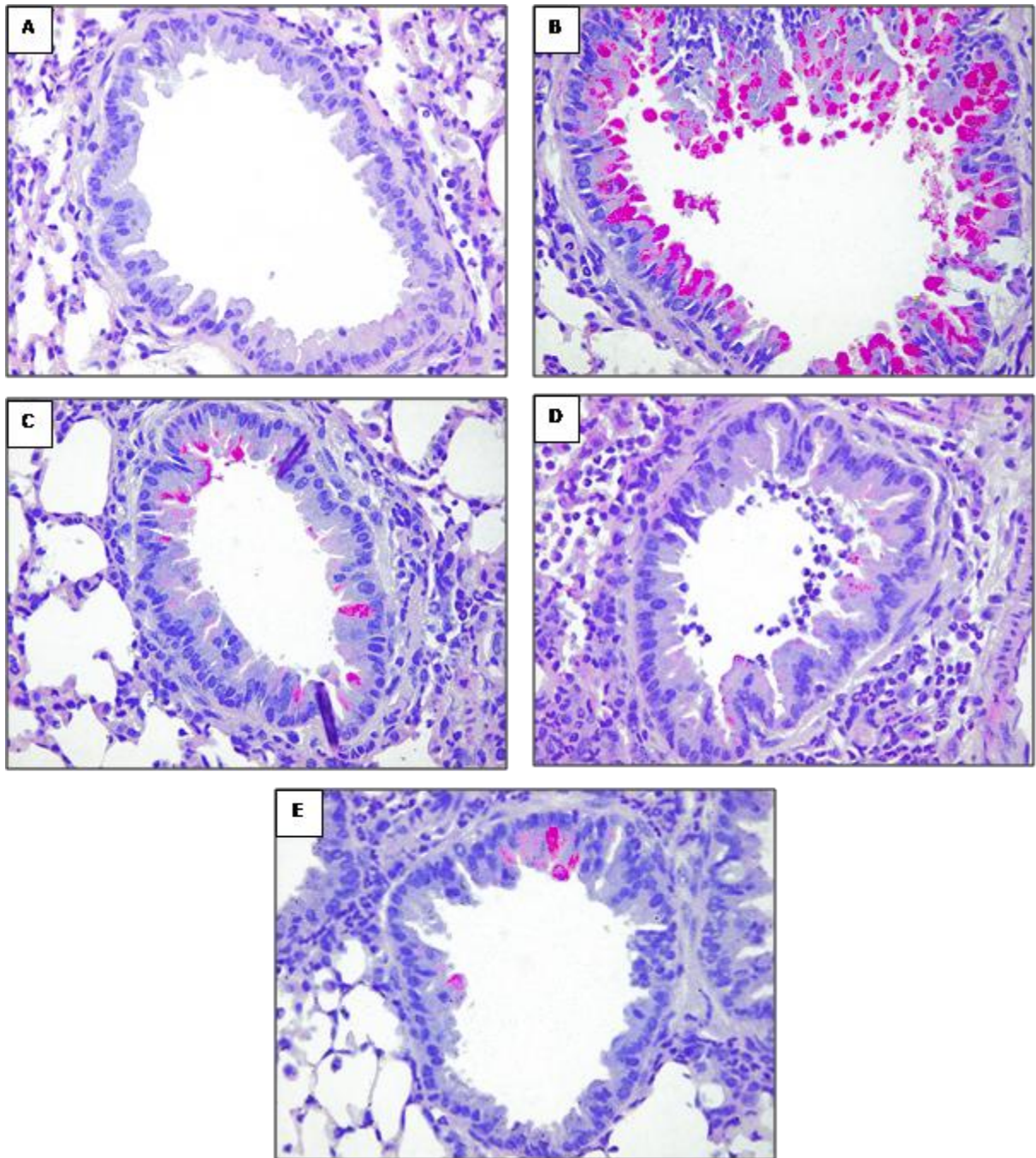


Figura 20. Avaliação da produção de muco nas vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 µg/animal). Estão representados cortes de pulmão corados com PAS (aumento de 400x) de camundongos sensibilizado e instilado com salina (A) e OVA (B) e de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com Ac2-26 50 µg/animal (C) 100 µg/animal (D) e 200 µg/animal (E).

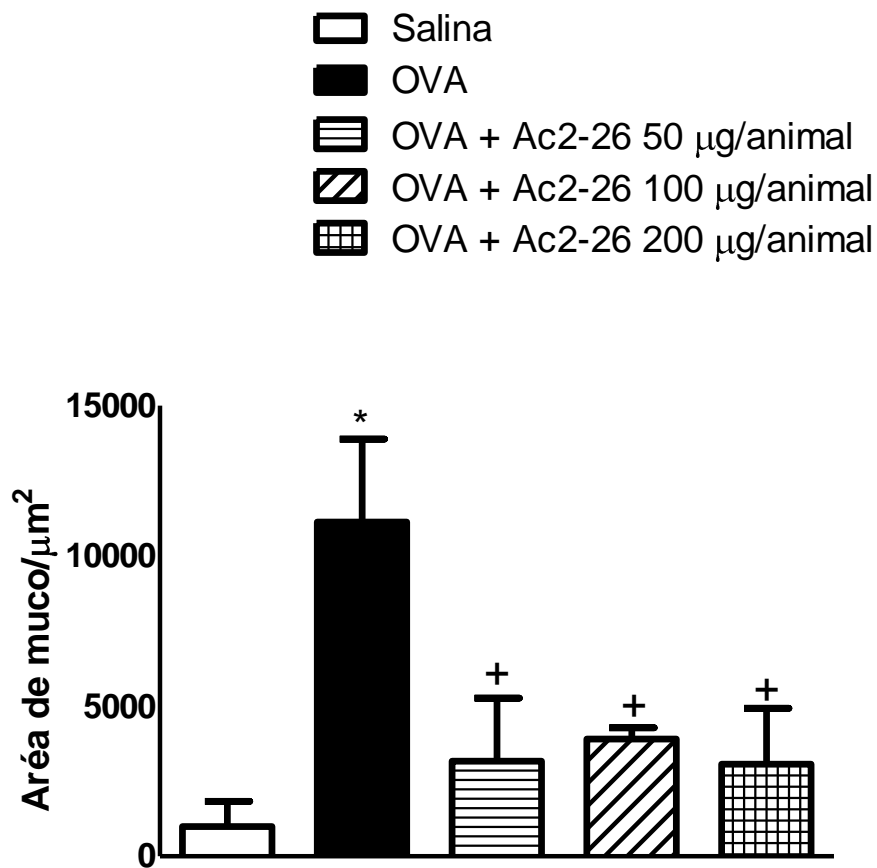


Figura 21. Análise quantitativa da produção de muco em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA ou instilados com salina, submetidos ao tratamento com o peptídeo Ac2-26 (50 - 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$). Os valores estão representados como média \pm erro padrão da média de um n experimental de 4 a 7 animais por grupo. O * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina; O + indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo OVA. A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma via seguida de Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

Asma é uma doença cuja incidência tem aumentado globalmente, colocando uma carga crescente nos serviços de saúde tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (BARNES, 2005). Episódios tosse, sibilos, sensação de opressão torácica e dispnéia constituem os principais sintomas desta patologia (Guidelines for management of asthma: a summary 1993) que afeta indivíduos de todas as faixas etárias. Caracteriza-se pela ocorrência de inflamação crônica das vias aéreas com marcada presença de eosinófilos e linfócitos T_H2 e mastócitos ativados. Estas células liberam uma ampla gama de mediadores responsáveis pela indução de broncoconstrição, aumento na produção de muco e remodelamento tecidual (HAMID e TULIC 2009). Esse último contribui de forma relevante para o espessamento das paredes das vias aéreas e, conseqüentemente, ao aumento na resistência à passagem do fluxo de ar (BERGERON, AL-RAMIL e HAMID, 2008).

As estratégias terapêuticas convencionais consistem na utilização combinada de broncodilatadores e agentes antiinflamatórios, dentre eles os mais utilizados são os B_2 -agonistas e os glicocorticóides, respectivamente (BARNES, 2004). Apesar de a asma alérgica moderada ser bem controlada com glicocorticóides inalados, alguns pacientes com quadros de asma grave necessitam frequentemente de glicocorticóides orais. No entanto, a utilização destes glicocorticóides em longo prazo pode levar a diversos efeitos colaterais (BARNES, 2004).

Foi demonstrado que parte das ações anti-inflamatórias dos glicocorticóides é mediada por uma proteína endógena de 37 kDa denominada anexina-1 (PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009). Esta proteína é capaz de se ligar aos fosfolipídios de membrana, através de um modo dependente de cálcio, e de promover a inibição da enzima PLA_2 e conseqüentemente da síntese de eicosanóides bem como de outras classes de mediadores inflamatórios lipídicos. Inúmeros estudos têm revelado a importância funcional da anexina-1 em uma variedade de vias inflamatórias, na proliferação celular, na regulação do sinal de morte celular, na fagocitose de células em apoptose e em importantes processos de carcinogênese (LINA, KIM e SHAZIB, 2006). Foi também evidenciado que o peptídeo derivado da região N-terminal da anexina-1 (Ac2-26) foi capaz de reproduzir as ações anti-inflamatórias da proteína íntegra (KAMAL, FLOWER e PERRETTI, 2005). Estes achados mostraram-se bastante promissores e apontam para o peptídeo Ac2-26 como uma ferramenta

terapêutica, alternativa ao uso de glicocorticóides, para o tratamento de doenças inflamatórias como a asma. No presente estudo objetivamos investigar o papel regulatório da anexina-1 e o potencial efeito do peptídeo Ac2-26 no modelo experimental de asma alérgica em camundongos.

A hiper-reatividade das vias aéreas é uma característica marcante na asma e está associada com a inflamação e a obstrução reversível das vias aéreas. A resposta excessiva das vias aéreas a uma variedade de estímulos leva um quadro de broncoconstrição, que é considerado como um fenômeno crucial para a resposta de hiper-reatividade das vias aéreas. Neste estudo usamos camundongos BALB/c (AnxA1^{+/+}) e nocautes para a proteína anexina-1 (AnxA1^{-/-}) ativamente sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, e observamos que a deleção do gene codificante para a proteína anexina-1 exacerbou a resposta de resistência pulmonar e de hiper-reatividade das vias aéreas verificadas nos camundongos desafiados antigenicamente. De forma bem interessante, notamos que os camundongos nocautes embora tenham apresentado níveis basais de resistência pulmonar equivalente aos dos camundongos selvagens, apresentaram um quadro de exacerbação da resposta broncoconstritora frente à estimulação com agente colinérgico metacolina. Em adição, ao analisarmos a elastância pulmonar, os camundongos nocautes para anexina-1 não apresentaram uma exacerbação da resposta basal quando comparados aos camundongos selvagens. Entretanto, com a aerolização da metacolina observamos um aumento da elastância nos camundongos nocautes, tanto na condição de estimulação antigênica ou não, quando comparado aos camundongos selvagens. Dados similares foram observados por Wong e cols. (2011) que relataram um aumento da hiper-reatividade das vias aéreas após a inalação do broncoconstritor metacolina em camundongos nocautes para a proteína anexina-1. Como o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas é uma das características marcantes da asma, e a ausência da proteína anexina-1 exacerbou o quadro de hiper-reatividade das vias aéreas, podemos concluir que a anexina-1 endógena parece possuir um importante papel regulador no desenvolvimento da resposta alérgica induzida por ovoalbumina.

O infiltrado eosinofílico tem um papel central na patogenia da asma (COHN, GEOFFREY e CHUPP, 2004). Após a ativação, os eosinófilos liberam seus grânulos contendo: mediadores inflamatórios e espasmogênicos como o leucotrieno C₄ e o PAF, que causam a broncoconstrição e a hipersecreção de muco; geração de

espécies reativas do oxigênio, que geralmente danificam as células mucosas; e proteínas básicas extremamente tóxicas ao epitélio como proteína básica maior (MBP), peroxidase do eosinófilo (EPO) e proteína catiônica do eosinófilo (ECP) que levam à ocorrência de descamação do epitélio das vias aéreas e dano neurogênico (HYVÄRINEN *et al*, 2009). Produtos derivados do eosinófilo têm sido encontrados em altas quantidades no escarro de pacientes asmáticos e estão diretamente envolvidos com o dano tecidual, a hipersecreção de muco, a deposição de matriz extracelular e a hiper-reatividade das vias aéreas (HAMID e TULIC, 2009). Nossos dados mostraram que na ausência da anexina-1 há uma potencialização do aumento no conteúdo de células presentes no lavado broncoalveolar dos camundongos sensibilizados e desafiados antígenicamente, em relação aos animais controles, fenômeno esse, devido em parte ao maior número de eosinófilos. Além disso, observamos um aumento expressivo do infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar dos camundongos nocautes desafiados antígenicamente, em comparação aos camundongos selvagens. Alguns estudos sugerem que a anexina-1 não possui envolvimento no recrutamento de eosinófilos (FALINE *et al*, 2004; TEIXEIRA *et al*, 1998). Entretanto, em trabalhos anteriores de nosso grupo (BANDEIRA-MELO *et al* 2005) foi demonstrado que o tratamento com o peptídeo derivado da região N-terminal da proteína anexina-1, o Ac2-26, no modelo de pleurisia induzida por ovoalbumina em ratos, ativamente sensibilizados, foi capaz de inibir a geração de eotaxina e o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para a cavidade pleural. Em adição, Wang e cols. (2010) mostraram que ratos estimulados antígenicamente e tratados com Ac2-26 apresentaram uma redução do número de eosinófilos e de mediadores inflamatórios, como IL-4, IL-5, IL-13 e eotaxina no lavado broncoalveolar. Dessa forma, podemos propor uma ação anti-eosinofílica para a anexina-1, que estaria atuando de forma indireta, ou seja, mediante inibição da síntese do mediador eosinofilotático eotaxina. O mesmo poderia ocorrer com outros mediadores indutores de recrutamento de eosinófilos.

A parede das vias aéreas de indivíduos asmáticos é infiltrada por outros tipos celulares como linfócitos T CD4, mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos. No lúmen das vias aéreas, o muco está repleto de macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células epiteliais que se desprenderam do tecido danificado (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). As células inflamatórias são responsáveis pela liberação de mediadores químicos que promovem uma retroalimentação positiva da resposta

inflamatória, como as citocinas e quimiocinas, que podem resultar em danos teciduais (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Os linfócitos T CD4 possuem uma grande importância na patogênese da asma, estas células produzem um padrão de citocinas T_h2 (IL-4, IL-5 e IL-13) que estão associadas à asma. Os nossos dados mostraram um aumento nos níveis da citocina IL-13 nos pulmões de camundongos nocautes desafiados antígenicamente, em comparação aos camundongos selvagens desafiados antígenicamente. Este dado corrobora com estudos que demonstram que a ausência da anexina-1 favorece a diferenciação dos linfócitos T CD4 para o fenótipo T_h2 , conseqüentemente acarreta no aumento de citocinas como IL-4 e IL-13 (D'ACQUISTO, 2007).

As citocinas são mediadores extremamente importantes no recrutamento e ativação das células efetoras relacionadas à resposta alérgica. A IL-13 promove o recrutamento seletivo de eosinófilos, macrófagos e linfócitos T nas vias áreas através do aumento da expressão VCAM-1 (moléculas de adesão vascular 1) (WILLS-KARP, 2004). Além disso, a IL-13 possui papel importante na secreção de muco e hiperresponsividade do músculo liso e no remodelamento brônquico (HAMID e TULIC, 2009). Os camundongos nocautes para anexina-1 apresentaram um aumento expressivo do conteúdo de colágeno no tecido pulmonar, o que provavelmente, em parte, é devido ao aumento da produção de IL-13. Sabe-se que essa citocina tem um papel chave na diferenciação e ativação dos fibroblastos, uma célula de grande importância no remodelamento no processo de remodelamento das vias aéreas na asma (HOLGATE e POLOSA, 2008). Estes resultados são suportados por estudos anteriores que demonstram o importante papel da anexina-1 sobre a ativação de fibroblastos pulmonares (KAMAL, FLOWER e PERRETTI 2005).

A hipersecreção de muco das vias aéreas é uma característica fisiopatológica de grande importância na asma, que está associada com mudanças nas vias aéreas como a hiperplasia das células caliciformes e hipertrofia das glândulas submucosas. O excesso de muco presente nas vias aéreas contribui de forma significativa para a mortalidade e morbidade de muitos pacientes asmáticos, principalmente naqueles que apresentam o quadro mais grave da doença (LAI e ROGERS, 2010). Secções de tecido pulmonar, obtidas na autópsia de pacientes com asma, apresentam um aumento de 20 vezes do número de células caliciformes nas vias aéreas periféricas quando comparado com indivíduos saudáveis. Os nossos dados demonstraram um

aumento de muco nas vias aéreas dos camundongos desafiados antígenicamente, porém a ausência da proteína anexina-1 não interferiu nesse parâmetro.

Em conjunto esses resultados mostram que os camundongos nocautes para o gene da anexina-1 foram mais responsivos à estimulação antigênica pulmonar, em comparação aos animais selvagens, indicando que a anexina-1 parece exercer um papel regulatório negativo sobre a resposta inflamatória alérgica em camundongos.

Dessa forma, em um segundo parte deste estudo, analisamos o efeito do peptídeo Ac2-26 sobre resposta inflamatória alérgica induzida por ovoalbumina em camundongos. Alguns estudos indicaram que o peptídeo derivado da região N-terminal da proteína anexina-1, o Ac2-26, foi capaz de reproduzir as ações anti-inflamatórias da proteína íntegra. Podemos destacar o efeito protetor do Ac2-26 em reduzir o dano do miocárdio associado com o processo isquêmico de reperfusão (LA *et al*, 2001), na modulação de macrófagos no processo de fagocitose de células apoptóticas (SCANNEL *et al*, 2007) e na redução do dano tecidual causado por oclusão arterial (CUZZOCREA *et al*, 1997). No modelo de asma utilizado nesse estudo, verificamos que o tratamento com o Ac2-26 foi capaz de reduzir os principais padrões característicos da resposta inflamatória do quadro asmático.

Inicialmente avaliamos a função pulmonar dos camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, e observamos que o tratamento com o peptídeo Ac2-26 não alterou a resistência e a elastância pulmonar basal, porém reduziu a hiper-reatividade das vias aéreas após a aerolização da metacolina em ambos os casos. Assim como observado nesse estudo, Wang e cols. (2010) relataram que a constrição das vias aéreas de ratos estimulados antígenicamente foi atenuada pelo tratamento com o Ac2-26. Estes dados mostram o importante papel desse peptídeo Ac2-26 em melhorar a função pulmonar de animais alérgicos.

Diversos estudos enfatizam a necessidade de supressão de respostas associadas a alterações inflamatórias decorrente do infiltrado eosinofílico, células que como já mencionado contribuem de forma importante para hiper-reatividade das vias aéreas de asmáticos. Uma vez recrutados para o trato respiratório, os eosinófilos secretam uma variedade de mediadores inflamatórios e proteínas tóxicas, os quais promovem alterações patológicas e um declínio da função pulmonar. Ademais, sabe-se que ocorre uma elevação no número de eosinófilos encontrados no sangue e nos efluentes bronquiais de pacientes asmáticos em crise. Portanto, torna-se evidente que um tratamento eficaz para a asma deve ter como um

dos alvos terapêuticos a eliminação dos eosinófilos no tecido pulmonar. O tratamento com o Ac2-26 foi capaz de reduzir o infiltrado celular no lavado broncoalveolar, assim como a análise histológica revelou uma redução acentuada do infiltrado celular, resultante principalmente da diminuição do número de eosinófilos. Esses resultados, obtidos no modelo murino de asma, confirmam os dados observados por Wang e cols (2010) no modelo de asma em ratos. Em adição, no estudo realizado por Bandeira-Melo e cols. (2005) foi demonstrado que o tratamento com o Ac2-26 reduziu a resposta inflamatória eosinofílica induzida por alérgeno no modelo de pleurisia em ratos, sendo esse efeito associado à redução na geração de mediadores inflamatórios. Dessa forma, avaliamos a ação do Ac2-26 sobre a produção de alguns mediadores inflamatórios, e observamos uma importante redução das citocinas IL-4 e IL-13 e das quimiocinas eotaxina-1 e 2 no tecido pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina. Esses mediadores são extremamente importantes no recrutamento e ativação das células efetoras relacionadas à resposta alérgica, como eosinófilos e mastócitos. A IL-4 e a IL-13 aumentam a adesão de eosinófilos às células endoteliais vasculares, permitindo sua migração para o parênquima pulmonar (WILLS-KARP e EWART 2004). As quimiocinas eotaxina-1 e eotaxina-2 são importantes quimioatratantes para eosinófilos na inflamação alérgica (HAMID E TULIC, 2009). Os dados obtidos sugerem que a redução dos eosinófilos no parênquima pulmonar está associada à menor produção de citocinas inflamatórias, e conseqüentemente na diminuição do infiltrado celular e da hiper-reatividade das vias aéreas. De acordo com dados na literatura, os mediadores que são secretados pelos eosinófilos estão associados com a destruição de células epiteliais das vias aéreas, aumento da produção de muco, fibrose, além de induzir broncoespasmos e hiper-reatividade das vias aéreas (COHN, ELIAS e CHUPP, 2004). Dessa maneira, acredita-se que parte do efeito anti-inflamatório do peptídeo Ac2-26 pode estar associado à inibição da produção de mediadores inflamatórios e da redução do infiltrado de eosinófilos no sítio inflamatório.

Uma característica importante no quadro asmático é o remodelamento tecidual, que caracteriza um conjunto de mudanças estruturais que ocorrem na parede das vias aéreas e incluem alterações epiteliais, hiperplasia das células musculares, aumento do número de fibroblastos/miofibroblastos ativados, fibrose subepitelial e alterações vasculares (TANG *et al.* 2006; AL-MUHSEN *et al.* 2011).

Nossos dados mostraram que o tratamento com o peptídeo Ac2-26 reduziu a deposição de colágeno no tecido pulmonar e a secreção de muco nas vias aéreas. Estes dados estão de acordo com a redução nos níveis da citocina IL-13 que possui um papel importante no remodelamento das vias aéreas.

O conjunto de dados mostrados sugere que a anexina-1 endógena possui um importante papel regulatório sobre a resposta inflamatória alérgica induzida por ovoalbumina. Em adição, esses dados indicam o peptídeo Ac2-26 como um promissor agente anti-inflamatório para a asma, devido à capacidade apresentada em bloquear eventos cruciais do quadro asmático através da redução da liberação de mediadores inflamatórios e na inibição de células efetoras na patogênese da asma.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto nossos resultados mostram que:

- A ausência da proteína anexina-1 resultou na exacerbação do quadro inflamatório, com o aumento nos níveis de citocinas, no acúmulo de eosinófilos no tecido, na hipersecreção de muco e na deposição de componentes de matriz na região peribrônquiolar, além da resposta de hiperreatividade brônquica induzida por metacolina.
- O peptídeo Ac2-26 foi capaz de reduzir de maneira importante à inflamação pulmonar em camundongos estimulados antígenicamente, promovendo a melhora do comprometimento da função pulmonar, bem como a diminuição da produção de citocinas, a secreção de muco e a deposição de componentes de matriz extracelular.

Em conjunto esses dados mostram que a proteína anexina-1 parece exercer um papel regulatório importante sobre a resposta inflamatória alérgica murina. Além disso, o peptídeo Ac2-26 mostrou-se capaz de reverter inúmeros fenômenos associados à inflamação alérgica pulmonar em camundongos, indicando claramente que o peptídeo pode constituir uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de doenças como a asma.

REFERÊNCIAS

Adock IM, Caramori G, Chung K. New targets for drugs development in asthma. *Lancet*. 2008; 372: 1073-87.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1): 18-27.

Akuthota P, Wang HB, Spencer LA, Weller PF. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 1254-63.

Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Set; 128(3): 451-62.

Bandeira-Mello C, Bonavita AG, Diaz BL, Carvalho VF, Jose PJ Flower RJ, et al. A novel effect for annexin 1-derived peptide ac2-26: reduction of allergic inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Jun; 313(3): 1416-22.

Barnes PJ. Current Therapies for Asthma: Promise and Limitations. *Chest*. 1997 Feb; 111Suppl 2: S16-26.

Barnes PJ, Adock IM. How do corticosteroids work in asthma?. *Ann Intern Med*. 2003; 139(5): 359-70.

Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discovery*. 2004 Oct; 3: 831-4.

Barnes PJ. Molecular mechanism and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2005; 25: 451-68.

Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles prize lecture 2005. *Br J Pharmacol*. 2006; 148: 245-54.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature*. 2008; 8: 182-92.

Barnes PJ. New therapies for asthma: is there any progress?. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31(7): 335-43.

Barret NA, Austen KF. Innate Cells and T Helper 2 Cell Immunity in Airway Inflammation. *Immunity*. 2009; 31: 425-37.

Bergeron C, Al-ramil W, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Proceedings of the Ame Thor Soc*. 2009 Aug; 19(6): 301-5.

Boswell-smith V, Cazzola M, Page CP. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline?. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117: 1237-43

Estatísticas de saúde e mortalidade. Secretaria Nacional de Ações Básicas. Ministério da Saúde: Brasília, 2005.

Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med*. 2001; 344: 350-62.

Chikanza IC, Kozaci D, Chernajovsky Y. The molecular and cellular basis of corticosteroid resistance. *J Endocrinol*. 2003; 179: 301-10.

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

Cover PO, Baanah-Jones F, John CD, Buckingham JC. Annexin 1 (lipocortin 1) mimics inhibitory effects of glucocorticoids on testosterone secretion and enhances effects of interleukin-1 β . *Endocrine*. 2002; 18(1): 33-9.

Cuzzocrea S, Tailor A, Zingarelli B, Salzman AL, Flower RJ, SZABO C, Perretti M. Lipocortin 1 protects against splanchnic artery occlusion and reperfusion injury by affecting neutrophil migration. *J Immunol*. 1997; 159: 5089–97.

D'Acquisto F, Paschalidis N, Sampaio ALF, Merghani A, Flower RJ, Perretti M. Impaired T cell activation and increased Th2 lineage commitment in Annexin-1-deficient T cells. *Eur J Immunol*. 2007; 37: 3131-42.

Dufton N, Perretti M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol Ther*. 2010; 127(2): 175-88.

Floistrup H, Swartz J, Bergström A, Alm JS, Scheynius A, van Hage M, *et al*. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117: 59-66.

Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci*. 1994; 15: 71–6.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky A M. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008; 454: 445-54.

Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jun; 6(6): 449-61.

Guidelines for management of asthma: a summary. Statement by the British Thoracic Society, Research Unit of the Royal College of Physicians of London, King's Fund Centre, National Asthma Campaign. *Br Med J*. 1993; 306: 776.

Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma. 2010.

Hayhoe RP, Kamal AM, Solito E, Flower RJ, Cooper D, Perretti M. Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. *Blood*. 2006; 107(5): 2123-30.

Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar; 8(3): 218-30.

Holt PG, Strickland DH. Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis: New perspectives from studies on acute exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(5): 963-72.

Homer RJ, ELIAS JA. Consequences of long-term inflammation: airway remodeling. *Clin Chest Med*. 2000 Jun; 21: 331-43.

IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol*. 2006; 32 Suppl 7: S447– 74.

Jenkins MA, Hopper JL, Bowes G, Carlin JB, Flander LB, Giles GG. Factor in childhood as predictors of asthma in adult life. *BMJ*. 1994 Jul 9; 309(6947): 90-3.

John CD, Gavins FNE, Buss NAPS, Cover PO, Buckingham JC. Annexin A1 and the formyl peptide receptor Family: neuroendocrine and metabolic aspects. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Dec; 8: 765-76.

Kamal AM, Flower RJ and Perretti M. An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100 Suppl 1: 39-47.

La M, D'Amico M, Bandiera S, Di Filippo C, Oliani SM, Gavins FN. Annexin-1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. *FASEB J*. 2001; 15: 2247-56.

Lai H, Rogers DF. New pharmacotherapy for airway mucus hypersecretion in asthma and COPD: targeting intracellular signaling pathways. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010; 23(4): 219-31.

Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10): 761-71.

Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*. 2009; 31(3): 412-24.

Lazaar AL, Panettieri RA. Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances. *Drugs discovery today: disease mechanisms*. 2004; 1(1): 111-6.

Lemanske RF, Busse WW. Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111 Suppl 2: S502-19.

Lim LHK, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*. 2007; 21: 968-75.

Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity*. 2009; 31(3): 438-49.

Murdich JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res*. 2009 Aug; 690(1-2): 24-39.

Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec; 2(12): 933-44.

Nagata M, Nakagome K. Allergen immunotherapy in asthma: current status and future perspectives. *Allergol Int*. 2010 Mar; 59(1): 15-9.

Nakajima H, Takatsu K. Role of cytokines in allergy airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007; 42: 265-73.

Nelson HS. Long-acting beta-agonist in adult asthma: Evidence that these drugs are safe. *Prim Care Respir J*. 2006; 15: 271-77.

Perretti M. The annexin 1 receptor(s): is the plot unraveling?. *Trends Pharmacol Sci*. 2003 Nov; 24(1): 574-79.

Perretti M, Dalli J. Exploiting the annexin A1 for the development of novel anti-inflammatory therapeutics. *Br J Pharmacol*. 2009; 158(4): 936-46.

Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature*. 2009 Jan; 9: 62-70.

Pollart SM, Compton RM, elwar D, Kurtis S. Management of acute asthma exacerbations. *Am Fam Physician*. 2011; 84(1): 40-7.

Renault JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 577-89.

Rolph MS, Sisavanh M, Liu SM and Mackay CR. Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. *Pharmacol Ther*. 2006; 109: 284-94.

Scannell M, Flanagan MB, Destefani A, Wynne KJ, Cagney G, Godson C, et al. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol*. 2007; 178(7): 4595-605.

Sistema de Informações Hospitalares do SUS - SIH/SUS. 2004. Disponível em: Acesso em:

Soroosh P, Doherty TA. Th9 and allergic disease. *Immunology*. 2009 Aug; 127(4): 450-8.

Tang MLK, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodeling in asthma: Current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther*. 2006 Nov; 112(2): 474-88.

Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002; 360: 1313-22.

Walters EH, Reid D, Soltani A, Ward C. Angiogenesis: a potentially critical part of remodeling in chronic airway diseases?. *Pharmacol Ther*. 2008; 118: 128-37.

Wills-Karp M, Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet.* 2004 May; 5(5): 376-87.

Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 583-94.