

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE – PPGS**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SAÚDE BRASILEIRA**

**NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA**

**CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO – CBR**

**Carolina de Lourdes Julião Vieira**

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE ASMA  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS BALB/C  
SUBMETIDOS A HIPERÓXIA**

**Juiz de Fora**

**2018**

**CAROLINA DE LOURDES JULIÃO VIEIRA**

**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE ASMA  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS BALB/C  
SUBMETIDOS A HIPERÓXIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Saúde Brasileira.

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

**Co-orientador:** Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

**Juiz de Fora**

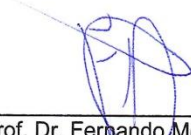
**2018**

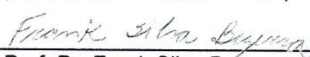
Vieira, C.L.J. **Avaliação de mediadores inflamatórios no modelo de asma experimental induzida por ovalbumina em camundongos BALB/c submetidos a hiperóxia.** Juiz de Fora (MG), 2018. 93f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Saúde – Doutorado em Saúde Brasileira) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora.


**AVALIAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE ASMA  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS  
BALB/C SUBMETIDOS A HIPERÓXIA**


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Saúde Brasileira.

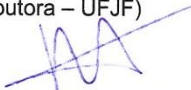
Avaliada em 2 de Março de 2018, pela Banca Examinadora composta por:


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup  
(Orientador – Doutor – UFJF)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Frank Silva Bezerra  
(Co-orientador – Doutor – UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Akinori Cardozo Nagato  
(Doutor – UFJF)

  
\_\_\_\_\_  
Profª Drª Maria Inês da Cruz Campos  
(Doutora – UFJF)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodrigo Guerra de Oliveira  
(Doutor – SUPREMA)

  
\_\_\_\_\_  
Profª Drª Chislene Pereira Vanelli  
(Doutora – FACSUM)

Dedico este trabalho a Larissa e Izabella, minhas filhas queridas e amadas que sempre estiveram comigo, entendendo minha ausência de mãe em prol dos meus estudos e dedicação nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e amparo nestes difíceis anos de dedicação e desenvolvimento deste projeto. À Nossa Senhora de Lourdes, pela proteção e amparo espiritual.

Agradeço ao meu orientador, mentor e exemplo de profissional, Professor Fernando Monteiro Aarestrup, por não ter desistido de mim neste tempo de desenvolvimento da tese. Pela paciência, ensinamentos, dedicação, exigências e dificuldades impostas ao longo dos quatro projetos desenvolvidos, no qual cresci muito, profissionalmente. Pessoalmente, agradeço ao meu cunhado pelo entendimento de minhas dificuldades pessoais e conciliação com trabalho, crianças e estudos.

À minha irmã Beatriz Julião Vieira Aarestrup, professora e exemplo de profissional. Não tenho palavras para lhe agradecer toda colaboração, incentivo, “puxões de orelha” e ensinamentos ao longo destes anos e neste final da tese. Você sempre foi e sempre será um exemplo de pessoa e profissional para mim. E escolhi a carreira da docência pelos ensinamentos e exemplo de profissionais que você e Fernando me deram desde a graduação.

À minha irmã, Tatiana Julião Vieira, pelas palavras de incentivo quando o cansaço era demais. Pela dedicação com as minhas filhas e cuidados a elas oferecido.

Ao meu amigo, Akinori Cardozo Nagato, que não me deixou desistir de continuar o doutorado. Como meu trabalho foi uma extensão do seu, sem você não conseguiria terminar esta jornada. Obrigada pela ajuda no laboratório, pela dedicação e ensinamentos. Pela confiança em mim enquanto pessoa e profissional. Não tenho palavras para agradecê-lo por tudo que fez por mim. Rezo por você e sua família, em agradecimento, todos os dias! Sou muito grata por Deus ter colocado você em minha vida, por trabalharmos juntos e por ter sua amizade sincera sempre!

Ao meu co-orientador, amigo e mentor, Professor Frank Silva Bezerra, que sempre acreditou em mim, no meu potencial, com palavras de amparo e incentivo sempre; por todas as vezes que liguei à noite, domingo, lhe perturbando, desesperada em prol de uma solução. Agradeço a você, Frank e a Ana Carla por me receberem

com tanto carinho na casa de vocês, para realizar uma parte das análises do doutorado na UFOP. Obrigada pelo aprendizado e pela paciência em me ensinar. Frank, você é um exemplo de professor para mim. Desde a graduação segui seus passos, fui sua monitora do 3º Período ao 10º Período e meu sonho era tornar-me professora de Anatomia. E me tornei, graças aos seus ensinamentos! Muito obrigada!

À minha mãe, Margaret Julião Motta Vieira, que mesmo estando no plano espiritual sei que está em orações por mim e pelas crianças e sabe exatamente o quanto abneguei de tudo em prol do desenvolvimento deste trabalho.

À minha avó, Anézia Pinhatti Julião, por todas as orações por mim e pelas crianças sempre. Meus tios Júlio, Zé e meus primos, Guilherme e Rodrigo, por entenderem minha ausência na família.

Às minhas amadas e queridas filhas, Larissa e Izabella, que mesmo sendo crianças souberam entender minha ausência como mãe, meu cansaço exagerado e minha dedicação extrema para ser mil mulheres em uma com a finalidade de sempre oferecer o melhor para elas. Vocês são minha vida e só consegui ter forças porque rezamos juntas e me apoiaram sempre!

À Ana Carolina Faria de Souza, por toda ajuda e incentivo durante todos estes anos, em conversas para eu não desistir e seguir em frente, o meu muito obrigada.

À Oswaldo Guilherme Schroter, pela paciência, tolerância, incentivo ao longo desta jornada. Pela dedicação em família e também pelas dificuldades impostas durante este tempo, que permitiram meu crescimento interior como pessoa, mãe e profissional.

Aos meus amigos de trabalho da Universidade de Vassouras, em especial, Elaine, agradeço por me ouvir serenamente, me incentivar, rezar comigo depois do trabalho nos momentos de desespero, por ser minha amiga de coração! À Cátia que não mediu esforços em me ajudar no trabalho, com palavras amigas e abraços de conforto. Ao Diego, Sebastião pelas risadas na Central de Estágios. Ao Marco Aurélio dos Santos Silva, meu amigo que esteve ao meu lado em todos os momentos da vida dizendo que eu iria vencer, que sou uma lutadora, lembrando-me sempre disto. Ao amigo Eduardo Trajano, pelos anos de trabalho juntos e incentivos mil para que mais esta etapa fosse concluída. Às minhas chefes, Consuelo Mendes e Lília Marques, que estiveram sempre a me apoiar e acreditar no meu trabalho de excelência na Universidade de Vassouras, o meu muito obrigada!

Às minhas amigas da pós-graduação em Equoterapia, em especial Carolina Guella e Fernanda Almeida, que mesmo de longe, uma em Chapecó e a outra em Goiânia, estamos pertinho toda semana conversando e apoiando uma a outra. Meninas, obrigada por me incentivarem neste meu propósito que foi o doutorado! Agradeço a Deus por ter colocado vocês em meu caminho!

Aos meus amigos e colegas do Centro de Biologia da Reprodução/CBR, em especial Harleson, com o qual dividir muitos momentos de angústia e ajuda mútua! Muito obrigada!

À minha orientadora da pós-graduação em Equoterapia, Professora Heloísa Grubits pelas palavras de carinho, pela amizade, por incentivar positivamente o término do doutorado e planejamentos futuros de trabalho e, na reta final, por ter me ajudado em busca de revistas científicas e publicações para enobrecer este trabalho.



“Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade.”

Cora Coralina

## **RESUMO**

A asma é considerada um problema de saúde pública mundial que envolve disparo de cadeia de eventos fisiopatológicos de difícil controle e tratamento. Estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas para que a doença possa ser estabilizada e controlada. Porém, os eventos fisiopatológicos que envolvem a doença ainda não são totalmente esclarecidos. Tendo em vista esta premissa, estudos experimentais são necessários e estão em crescente desenvolvimento na comunidade científica com a finalidade de esclarecer o padrão de resposta inflamatória desencadeada no processo. Tanto em humanos quanto em camundongos BALB/c o processo fisiopatológico da asma desencadeia resposta celular clássica via células T helper 2 (Th2) com liberação de interleucinas (IL) inflamatórias. Além destes, infiltrado de macrófago, eosinófilos, mastócitos. Estudos evidenciam um desvio na via de desencadeamento desta resposta para via de células T helper 1 (Th1) mediada por IL-2 e interferon gama ( $IFN\gamma$ ). A ativação da via celular Th17 também é citada, porém não totalmente elucidada quanto ao processo de imunorregulação. O objetivo do presente estudo foi verificar os mecanismos imunológicos pelos quais a hiperóxia leva a lesões em vias aéreas inferiores e parênquima pulmonar em modelo de asma experimental induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c. Para isto, realizamos a análise histopatológica do infiltrado inflamatório, do colágeno e do muco, por colorações histoquímicas, em amostras de tecido pulmonar, e quantificação dos níveis de interleucina 10 (IL-10), interleucina 22 (IL-22) e interleucina 17 (IL-17), pelo método ELISA, e nitrito ( $NO_2$ ), pelo método de Greiss, no lavado broncoalveolar. Os dados sugerem que a polarização para o fenótipo Th17 induzida pela hiperóxia é acompanhada por níveis mais altos no LBA, de IL-17,  $NO_2$ , IL-10 e de IL-22.

**Palavras-chave:** asma, hiperóxia, interleucina, quimiocina, resposta imune, camundongo.

## **ABSTRACT**

Asthma is considered a worldwide public health problem that involves a chain of pathophysiological events of difficult control and treatment. Therapeutic strategies have been studied so that the disease can be stabilized and controlled. However, the pathophysiological events involving the disease are not yet fully understood. In view of this premise, experimental studies are necessary and are under increasing development in the scientific community in order to clarify the pattern of inflammatory response triggered in the process. Both in humans and in BALB/c mice the pathophysiological process of asthma triggers classical cell response via helper T (T<sub>2</sub>) cells with release of inflammatory interleukins (IL). In addition, macrophage infiltrates, eosinophils, mast cells. Studies evidence a shift in the pathway of triggering this response to IL-2 and interferon gamma-mediated helper 1 (Th1) via pathway. Activation of the Th17 cell pathway is also cited, but not fully elucidated as to the immunoregulation process. The objective of our study was to verify the immunological mechanisms by which hyperoxia leads to lesions in the lower airways and pulmonary parenchyma in a model of experimental asthma induced by OVA in BALB / c mice. We performed the histopathological analysis of the inflammatory infiltrate, collagen and mucus, by histochemical staining, in lung tissue samples, and quantification of interleukin-10 (IL-10), interleukin-22 (IL-22) and interleukin-17 (IL-17), by the ELISA method, and nitrite (NO<sub>2</sub>), by the method of Greiss, in bronchoalveolar lavage. The data suggest that the polarization for the Th17 phenotype induced by hyperoxia is accompanied by highest levels in the BAL of IL-17, NO<sub>2</sub>, IL-10 and IL-22.

**Key words:** asthma, hyperoxia, interleukin, chemokine, immune response, mouse.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Processo de sensibilização ao antígeno específico (Allergen). Células dendríticas reconhecendo o antígeno, migrando para os linfonodos regionais e apresentando o antígeno às Células T virgens, induzindo a ativação de Células Th2 e Células B. Células B está secretando IgE específica para o plasma. E observa-se um mastócito com IgE específico, com ligante de alta afinidade (FceRI). Adaptado de (Galli, et al. 2008).....24
- Figura 2 Resposta imune asmática à exposição ao antígeno, após processo de sensibilização. Células Th2 e Mastócitos participando da ativação de eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células caliciformes. À esquerda Células Th17 induzindo a broncoconstrição. Adaptado de (Galli et al, 2008).....25.
- Figura 3 Polarização de células Th1 e Th2 na asma. O fator de transcrição Tbet direcionando padrão para resposta Th1 e GATA3 para Th2. Adaptado de (Vercelli, 2008).....27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$O_2^-$	Ânion superóxido
LABA	Broncodilatador de ação prolongada
NK	Célula <i>natural killers</i>
ICS	Corticosteroide inalatório
CXCL1	CXC quimiocina ligante 1
HNE	Elastase neutrofílica humana
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCF	Fator de células tronco
TGF $\beta$ 1	Fator de crescimento de transformação beta 1
CRO-a	Fator de crescimento relacionado ao antígeno
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
GATA3	Fator de transcrição GATA3
STAT4	Fator de transcrição STAT4
Tbet	Fator de transcrição Tbet
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos
HE	Hematoxilina e eosina
Al(OH) $_3$	Hidróxido de alumínio
IgE	Imunoglobulina-E
GINA	Iniciativa global para asma

HALI	Injúria hiperóxica pulmonar aguda
IFN $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
BAL	Lavado broncoalveolar
Th	Linfócitos T helper
TSLP	Linfopoiatina estromal tímica
C	Linfotactina quimioatratora de linfócitos
LPS	Lipopolissacarídeo
NO <sub>2</sub>	Nitrito
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde
PAS	Ácido periódico de Schiff
OVA	Ovalbumina
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
O <sub>2</sub>	Oxigênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
ONOO <sup>-</sup>	Peróxido nitrito
PtCO <sup>2</sup>	Pressão de dióxido de carbono
MDC ou CCL22	Quimiocina derivada de macrófago
CCL17	Quimiocina ligante CC17
CCR3	Receptor 3 de quimiocina CC
PBS	Tampão Fosfato

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 A asma e sua epidemiologia.....	18
2.2 Padrão de resposta imunológica na asma.....	19
2.3 Relação hiperóxia/asma e a modificação do padrão de resposta imunológica.....	23
2.4 Interleucinas e quimiocinas relevantes na resposta imune da asma.....	25
2.4.1 Quimiocina derivada de macrófagos.....	27
2.4.2 Interleucina 10.....	28
2.4.3 Interleucina 17.....	28
2.4.4 Interleucina 22.....	30
2.5 Modelos animais no estudo da fisiopatologia da asma.....	31
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>33</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 Objetivo geral.....	34
4.2. Objetivos Específicos.....	34
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
5.1 Animais.....	35
5.2 Indução experimental da asma.....	37
5.2.1 Sensibilizados com OVA intraperitoneal e/ou injeção de PBS diluído em Al(OH) <sub>3</sub> .....	37
5.2.2 Instilação intranasal com OVA ou PBS e nebulização com metacolina ou PBS .....	37
5.3 Modelo de exposição ao oxigênio.....	38
5.4 Eutanásia.....	38
5.5 Obtenção das amostras.....	39
5.6 Processamento histológico das amostras.....	40
5.7 Análise histopatológica .....	41
5.8 Homogeneizado pulmonar.....	41
5.9 Análise estatística .....	42

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE 1: Ofício CEUA.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE 2: Hematoxilina e eosina (HE) .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE 3: <i>Coloração histoquímica tricrômio de Gomori</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE 4: <i>Método do ácido periódico reativo de Schiff (PAS)</i> .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE 5: <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE 6: Carta de Aceite .....</b>	<b>90</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória alérgica, obstrutiva. Clinicamente, exhibe hiperresponsividade brônquica, caracterizada pelo aumento do grau de estreitamento das vias aéreas inferiores em resposta a estímulos bronco constritores (RUBIN et al, 2012; ASBAI, 2018). Experimentalmente, a responsividade anormal é reconhecida por resposta bronco constritora exagerada a agentes bronco ativos inalados ou a estímulos físicos induzidos (RUBIN et al, 2012).

Epidemiologicamente, a asma é extremamente relevante, considerada um problema de saúde pública no Brasil, com taxa de mortalidade de 2,29 por 100.000 habitantes, no ano de 2000 (WEHRMEISTER et al, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), estima-se que 235 milhões de pessoas sofram de asma; especificamente no Brasil, aproximadamente 20% das crianças têm a doença. De acordo com os dados da GINA, 2017, a asma é a doença com maior morbidade crônica em adultos e crianças, afetando gravemente a qualidade de vida dos pacientes, além de ser a 5ª. causa de internação em sistemas de saúde pública (ASBAI, 2018).

Segundo a *Global Initiative for Asthma* (GINA, 2017), muitos fenótipos têm sido identificados na caracterização da asma, como a asma alérgica (de início na infância, associada a história familiar ou pregressa de eczema, rinite alérgica, alergia alimentar ou à medicamentos; apresenta inflamação eosinofílica nas vias respiratórias), a asma “não alérgica” (escassa inflamação neutrofílica ou eosinofílica); asma de início tardio (sintomas da asma apenas na vida adulta); asma com limitação fixa ao fluxo aéreo (limitação persistente ao fluxo aéreo provavelmente devido ao remodelamento brônquico) e asma associada a obesidade (escassa inflamação eosinofílica).

Destaca-se que, apesar de ser comumente associada às vias aéreas inferiores, o fato da asma ser uma doença inflamatória alérgica, independente do fenótipo, seus mecanismos fisiopatológicos desencadeiam uma cascata de eventos imunológicos sistêmicos, por vezes se associando a manifestações como rinite, em vias aéreas superiores, hipersecreção em parênquima pulmonar e lesões em pele na dermatite atópica, dentre outras. (GELLER, 2002; LEITE et al 2007; ASBAI, 2018).

Na última década, além de se considerar os fenótipos da asma, seus endótipos vêm sendo discutidos na literatura e são de particular relevância para o desenvolvimento de terapias biológicas pois a escolha do tratamento é determinada pela fisiopatologia da doença. Do ponto de vista terapêutico, a asma é dividida em endótipos Th2 e endótipos não-Th2 (REGATEIRO et al, 2017).

De acordo com a responsividade ao tratamento a asma é classificada em leve (uso de medicação de alívio ou doses baixas de corticosteroide inalatório ou antagonistas de leucotrieno), moderada (bem controlada com o uso da associação de broncodilatador de ação prolongada (LABA) associado a corticosteroide inalatório (ICS) em baixa dose) e severa ou grave (uso de altas doses de ICS e LABA ou não controlada com o tratamento) (COLICE, 2004; GINA, 2017).

Dada a gravidade da condição clínica da asma severa, diversas terapias complementares vêm sendo empregadas na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Dentre estas terapias cita-se a administração de oxigênio (oxigenoterapia), na qual altas concentrações de oxigênio são utilizadas nas exacerbações agudas. No entanto, este procedimento tem sido amplamente discutido na literatura, pois diversos resultados têm demonstrado que altas concentrações de oxigênio (hiperóxia) podem causar lesões alveolares difusas, de natureza inflamatória, caracterizando uma condição denominada lesão hiperóxica pulmonar aguda (HALI) (PALOMINO, MARTI, 2015).

Imunopatologicamente, o estabelecimento da HALI leva à infiltração leucocitária com produção de espécies reativas, citocinas e fatores de crescimento. Como consequência destes eventos há edema e dano ao parênquima pulmonar (PALOMINO, MARTI, 2015).

O infiltrado inflamatório das vias aéreas na asma é regulado pela síntese de diversas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ). A inflamação pode ter padrão celular variável, porém, destacam-se em proporções diversas os subtipos de linfócitos, além de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Um importante regulador da população de linfócitos T é a proteína GATA-3, que favorece a diferenciação de linfócitos Th0 em Th2, suprimindo o perfil Th1 (PALOMINO, MARTI, 2015).

As células T17 (Th17) produzem interleucina 17 (IL-17), interleucina 21 (IL-21) e interleucina 22 (IL-22) e funcionalmente, a efetividade desta população celular é determinada por seus padrões de citocinas e alguns autores sugerem que as mesmas participam da transição entre a resposta inata e a resposta adaptativa. Via produção de IL-17 atua induzindo a resposta inflamatória e, associadas a outras citocinas a população Th17 favorece a atividade antimicrobiana (OPPMANN et al, 2000; PARK et al, 2005).

Outro regulador celular relevante é a quimiocina derivada de macrófagos (MDC ou CCL22). Sua síntese, realizada principalmente por macrófagos e células dendríticas, é induzida por citocinas Th2 e é quimiotática para células dendríticas e para as próprias células Th2 (MANTOVANI et al, 2000; YAMASHITA, 2002). Segundo estes autores, esta quimiocina, em altas concentrações, desperta um “*respiratory burst*”, que gera espécies reativas de oxigênio (ROS).

Na asma, além das ROS estão presentes espécies reativas de nitrogênio (RNS), óxido nítrico (NO), nitrito (NO<sub>2</sub>), peróxido nítrico (ONOO<sup>-</sup>) (BARNES, 2008; CARVALHO et al, 2015). Diversos autores sugerem que as lesões alveolares observadas na HALI estão associadas especialmente à liberação de derivados de nitrogênio e à produção de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CARVALHO et al, 2015).

Deste modo, considerando que a asma é um problema relevante de saúde pública e que muitos dos casos de asma severa não respondem a tratamentos farmacológicos, a oxigenoterapia deve ser considerada para melhor qualidade de vida dos indivíduos. Porém, a hiperóxia pode desencadear eventos imunológicos que participam da patogênese da HALI, levando, secundariamente, a lesões pulmonares.

O presente trabalho propôs, diante do exposto, investigar a influência da hiperóxia nos níveis de interleucinas (IL-22, IL-17, IL-10), além da densidade de colágeno, infiltrado inflamatório e presença de muco, em modelo experimental de asma induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A asma e sua epidemiologia

A asma é uma doença inflamatória alérgica, obstrutiva das vias aéreas inferiores, com reação brônquica exagerada, com bronco constrição e aumento de secreção, desencadeada por fatores como poluentes, atividade física, mudança de temperatura, partículas alergênicas irritantes dentre outros (ASBAI, 2018). É classificada em leve, moderada e severa, de acordo com a resposta do paciente a tratamentos clássicos e alguns preditivos diagnósticos avaliativos são importantes na avaliação do prognóstico, como função pulmonar, volume de força expiratória e resultado da espirometria (GINA, 2015).

Cerca de 300 milhões de pessoas no mundo são asmáticas, sendo 6,4 milhões de brasileiros; é a quinta causa mais frequente de internação, responsável em 2015 por mais de 100 mil internações no SUS, sendo dispendiosa para os programas de saúde pública (OMS, 2015).

Embora a taxa de mortalidade tenha diminuído na última década, a alta morbidade é relevante afetando negativamente a qualidade de vida e levando ao afastamento do indivíduo de suas atividades rotineiras (WEHRMEISTER et al, 2012, GINA, 2015, SANTO, 2006).

Por ser um problema de saúde pública com índices de casos crescentes no Brasil e no mundo, são necessários estudos que busquem melhor controle da doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Para tal, é fundamental o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos e imunológicos que desencadeiam a asma e determinam sua gravidade.

## 2.2 Padrão de resposta imunológica na asma

No processo fisiopatológico da asma há uma resposta clássica envolvendo aumento de células T auxiliares (TCD4+) nas vias aéreas com predomínio de células T *helper 2* (Th2). O processo de sensibilização é desencadeado após a exposição a um agente agressor, antígeno específico (Figura 1).

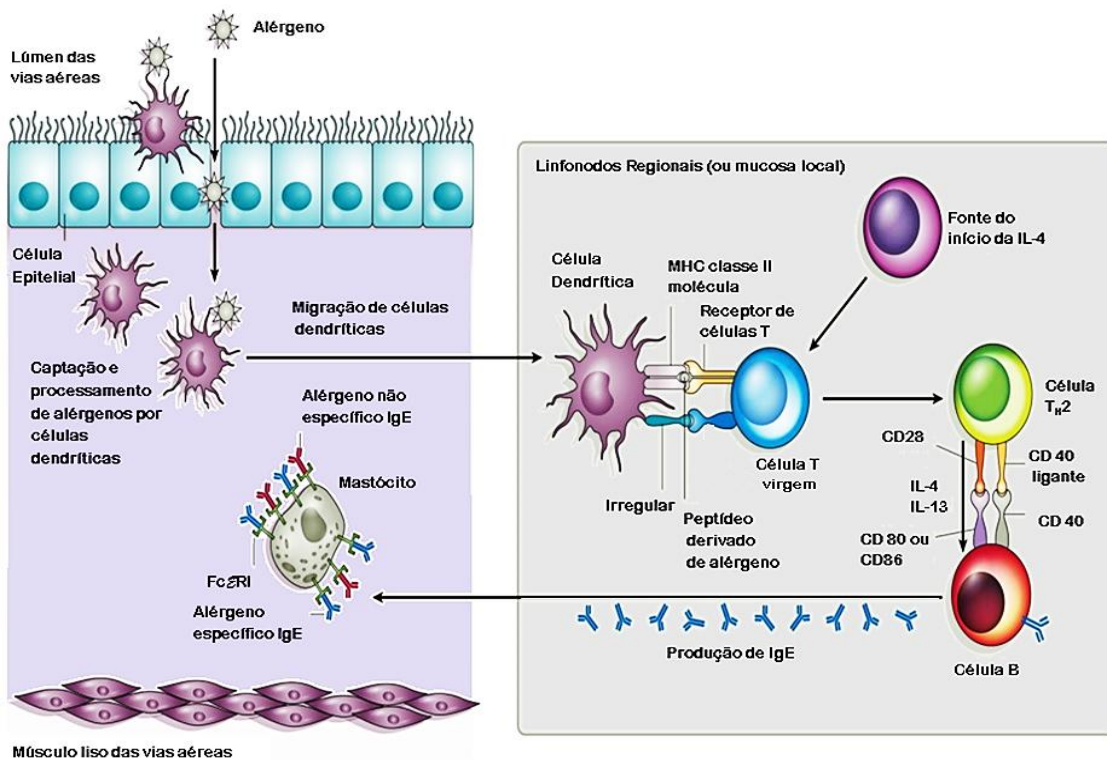


Figura 1: Processo de sensibilização ao antígeno específico (Allergen). Células dendríticas reconhecendo o antígeno, migrando para os linfonodos regionais e apresentando o antígeno às Células T virgens, induzindo a ativação de Células Th2 e Células B. Células B está secretando IgE específica para o plasma. E observa-se um mastócito com IgE específico, com ligante de alta afinidade (FceRI). Adaptado de (Galli, et al. 2008)

Após a fase de sensibilização acontece uma resposta secundária caracterizada pela liberação de interleucinas (IL) inflamatórias, classicamente IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 (Galli, Tsai et al., 2008). Além disto, nas vias aéreas há presença de infiltrado inflamatório misto, composto por macrófagos, eosinófilos, mastócitos (Figura 2)

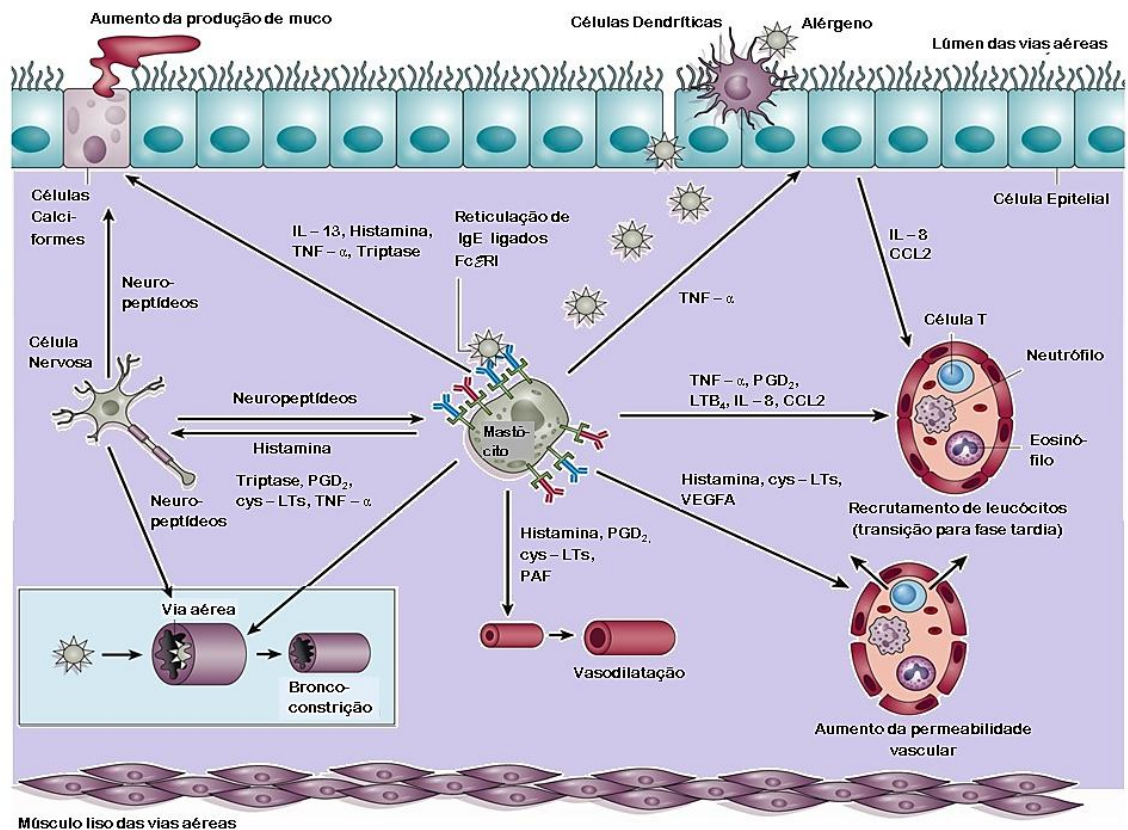


Figura 2 – Resposta imune asmática à exposição ao antígeno, após processo de sensibilização. Células Th2 e Mastócitos participando da ativação de eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células calciformes. À esquerda Células Th17 induzindo a broncoconstrição. Adaptado de (Galli et al, 2008)

No decorrer deste processo, os antígenos alojados nas vias aéreas ativam três mecanismos:

1. Mastócitos sensibilizados por meio do receptor de IgE induzem a liberação de mediadores que estimulam a broncoconstrição, incluindo: leucotrienos cisteínicos (C4, D4, E4), prostaglandina D2 (ABRAHAM, JOHN 2010);
2. As células epiteliais liberam Fator de Células-Tronco (SCF) que promovem a manutenção dos mastócitos na mucosa da superfície das vias aéreas (BARNES, 2008);
3. As células dendríticas mielóides processam os alérgenos (condicionados por linfopietina estromal tímica (TSLP), proveniente tanto das células epiteliais quanto de mastócitos), e liberam quimiocina ligante CC-17 (CCL17) e CCL22, que atua sobre o receptor 4 de quimiocina CC (CCR4), atraindo células Th2 para as vias aéreas (HOLT et al., 2008).

A resposta Th2 é ativada durante o processo inflamatório contra o patógeno extracelular, desencadeando resposta inflamatória mediada por interleucinas. A IL-9 estimula a proliferação de mastócitos. Tanto a IL-4 e a IL-13 estimulam as células B a sintetizar IgE. Enquanto a IL-5, também induzida pelas células epiteliais, estimula o recrutamento eosinofílico (Galli et al, 2008).

A via de resposta Th2 está relacionada ao fator transcricional GATA3 aumentada na asma por indução da IL-4. O fator transcricional GATA3 inibe a STAT4 que passa a não ativar o fator de transcrição Tbet, reduzindo o recrutamento das células Th1 (VERCELLI, 2008) (Figura 3).



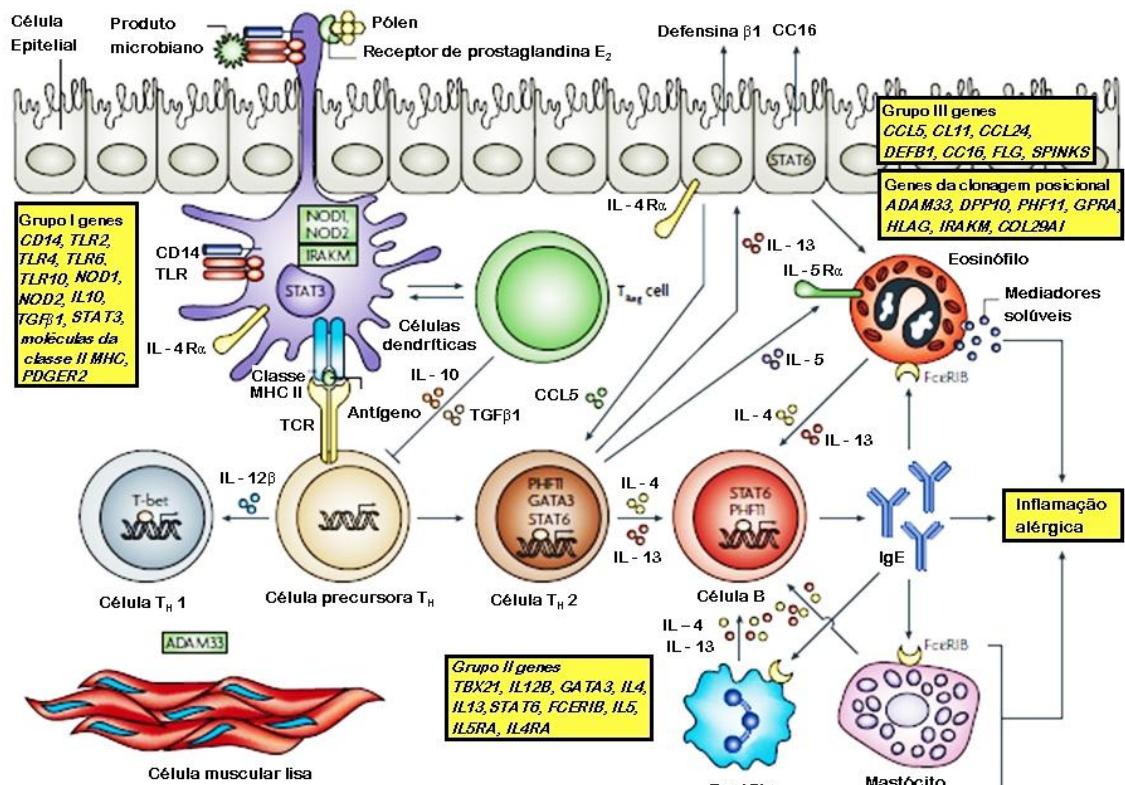


Figura 3 – Polarização de células Th1 e Th2 na asma. O fator de transcrição Tbet direcionando padrão para resposta Th1 e GATA3 para Th2. Adaptado de (Vercelli, 2008)

Evidências científicas demonstram que nesta via há presença das células Th1 produzindo interferon-gama (IFN $\gamma$ ), mesmo na asma severa, assim como na resposta contra patógenos intracelulares como bactérias, fungos e vírus (Mosmann e Coffman, 1989). O envolvimento do IFN $\gamma$  na asma está relacionado à hiperresponsividade das vias aéreas e tem participação na fisiopatologia desta doença, mas seu papel ainda não está totalmente esclarecido e é controverso em comparação com a via Th2 (VOCK et al, 2010; YAO et al, 2012)

As citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 atuam potencialmente como um *feedback* para amplificar a diferenciação das células T em células Th1 e Th2 (MOSMANN, COFFMAN, 1989). Porém, a relação Th1/Th2 ainda não foi totalmente elucidada na fisiopatologia da asma. Quando há o desvio para perfil Th1 (resposta

mediada por IL-2 e IFN $\gamma$ ), a regulação negativa das células Th2 é induzida pelo aumento da expressão de Tbet, que suprime GATA3 (BARNES, 2008).

As células Th17, por sua vez, produzem IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21 e IL-26 (Zhu *et al.*, 2008). A diferenciação, amplificação e manutenção das células T virgens em Th17 são mais eficientes quando há indução por TGF $\beta$ , IL-21 e IL-6 (VOCK *et al.*, 2010).

As células Th17 são conhecidas como potentes indutoras de inflamação do tecido, associadas a patogênese de muitas doenças auto-imunes e experimentais (KORN *et al.*; 2007).

Apesar da participação das células Th17 ser sugerida por diversos autores como participante da patogênese da asma severa, o papel da IL-17 no processo de imunorregulação é pouco conhecido (HOLT *et al.*, 2008; VOCK *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2012).

### 2.3 Relação hiperóxia/asma e a modificação do padrão de resposta imunológica

Liu e colaboradores (2016) descreveram como injúria pulmonar aguda hiperóxica (HALI) as condições patológicas cujos danos pulmonares foram causados pela elevada pressão exercida pelos altos níveis de oxigênio. A resposta imunológica associada à HALI envolve exsudação de leucócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias e edema pulmonar. A presença de infiltrado inflamatório rico em neutrófilos no parênquima pulmonar e o aumento da produção de óxido nítrico (NO) parecem exercer papel importante na patogênese da HALI (MATUTE-BELLO *et al.*, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2016).

Pesquisas envolvendo seres humanos vêm abordando os possíveis efeitos da

hiperóxia asma.

Em modelo experimental clássico de asma induzida, em camundongos, diversos autores observaram que a hiperóxia induz o aumento de IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  nos pulmões (BHANDARI, ELIAS, 2006; NAGATO et al, 2012). Estas são citocinas comumente observadas na resposta Th1, e não Th2, como observa-se classicamente na resposta imunológica na asma. Em mesmo modelo, Barnes (2008) e Nagato e colaboradores (2009) obtiveram resultados que sugerem que a hiperóxia induz o estresse oxidativo na asma severa. Ainda no modelo experimental, Li e colaboradores (2011) relatam que na hiperóxia há aumento dos níveis de TGF $\beta_1$ , citocina que modula, conjuntamente com a IL-6, a diferenciação das células T virgem em células Th17.

Perrin e colaboradores (2011) desenvolveram estudo com 106 pacientes com asma grave e crises de exacerbação, que foram randomizados para receber terapia com alta concentração de oxigênio (8l/min via máscara de média concentração) ou receber oxigênio titulado (para atingir saturações de oxigênio entre 93% e 95%), ambos por 60 minutos. Os autores observaram que no grupo que recebeu a oxigenoterapia em alta concentração houve aumento significativo da pressão do dióxido de carbono (PtCO $_2$ ). Diante dos resultados, os autores sugeriram que um regime de oxigênio titulado fosse recomendado no tratamento da asma grave, na qual o oxigênio é administrado apenas a pacientes com hipoxemia.

A relação direta entre o sistema óxido-redução e a resposta imune de células Th2 na asma (JUNGSUWADEE et al, 2012), reforça ainda mais a hipótese de haver relação entre a hiperóxia e modificação da resposta inflamatória imunológica na asma.

Diversos estudos tentam esclarecer os mecanismos que desencadeiam o estabelecimento, a gravidade e as exacerbações da asma, bem como determinar a intensidade e os padrões inflamatórios mensuráveis (WENZEL, 2012). Portanto, são

sugeridos estudos experimentais que elucidem o processo que determina e desencadeia o padrão de resposta com liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias.

#### 2.4 Interleucinas e quimiocinas relevantes na resposta imune da asma

As quimiocinas são proteínas solúveis capazes de controlar adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária. Contribuem para desenvolvimento dos processos imunológicos participando principalmente como indutoras de migração e ativação; a maioria das quimiocinas apresenta um padrão de expressão pró-inflamatórias importante, além de desempenhar papel primordial no retorno da célula a sua homeostase fisiológica após agressão. (MELLADO et al, 2001; JIN et al, 2008; GUERREIRO et al, 2011).

São tipicamente induzidas por monócitos e macrófagos além das células epiteliais, endoteliais ou fibroblastos por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (INF- $\gamma$ ) e por estímulos externos como lipopolissacarídeo (LPS). Outras quimiocinas são especificamente induzidas por citocinas envolvidas na resposta Th2 (IL-4, IL-10, IL-13), em monócitos e outras células. As evidências listadas acima levam a crer que certas quimiocinas está associada a respostas Th1 (pró-inflamatórias) enquanto outras estarão associadas a respostas Th2 (ROSSI et al, 2000; MELLADO et al, 2001; RAJAGOPALAN et al, 2006; SOLDEVILA et al, 2007; JIN et al, 2008 GUERREIRO et al, 2011)

As quimiocinas são subdivididas em subfamílias de acordo com o espaçamento entre os aminoácidos existentes nos resíduos de cisteína da extremidade N-terminal. As subfamílias possuem receptores que controlam a migração e resistência das

células do sistema imune. Temos quatro subfamílias de quimiocinas, sendo as duas primeiras mais importantes: quimiocina CC (maior das subfamílias), CXC, CXC3 e C (linfotactina quimioatratora de linfócitos). Os receptores de quimiocinas são ligados a proteína G (ROSSI et al, 2000; RAJAGOPALAN et al, 2006; SOLDEVILA et al, 2007).

As quimiocinas CC, que desempenham papel importante na inflamação crônica e na resposta alérgica, contém um resíduo de cisteína, localizados no cromossomo 17, responsáveis pelo estímulo de monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos T, células NK (ROSSI et al, 2000; RAJAGOPALAN et al, 2006; SOLDEVILA et al, 2007).

A outra subfamília de quimiocinas, as CXC, exibem um aminoácido entre as duas primeiras cisteínas, localizadas no cromossomo 4 e são responsáveis pelo estímulo quimiotático de neutrófilos (MELLADO et al, 2001; JIN et al, 2008; GUERREIRO et al, 2011).

As interleucinas são proteínas produzidas principalmente por linfócitos T, macrófagos e eosinófilos, com suas funções específicas mas de um modo em geral associadas à ativação ou inibição imunológica, além de algumas participarem da indução mitótica agindo como fatores de crescimento (MENACHEM-ZIDON, 2010).

Atualmente, mais de 36 tipos de interleucinas foram identificados e, apesar de anteriormente receberem denominações de acordo com sua função, a denominação aceita universalmente é sua representação por números, pela ordem da sua descoberta, visto que as mesmas apresentam múltiplas funções e torna a linguagem científica uniforme. Os efeitos das interleucinas dependem de sua célula alvo e a maioria destes efeitos ocorre em cadeia formando uma rede complexa nas diversas condições patológicas (ALAVERDI, SEHY, 2007).

#### 2.4.1 Quimiocina derivada de macrófagos

Um dos membros da família das quimiocinas CC é a quimiocina derivada de macrófagos (MDC ou CCL22), composta por 69 resíduos de aminoácidos. A MDC é principalmente produzida por macrófagos e células dendríticas após estímulo com produtos microbianos ou anticorpo anti-CD40 (YAMASHITA, KURODA, 2002).

A MDC é regulada positivamente por citocinas do perfil tipo Th2, tais como IL-4 e IL-5 e regulada negativamente pelo IFN $\gamma$ , produzido por células Th1. Além de associadas às células Th2, a MDC também é regulada positivamente por agentes indutores de prostaglandina e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP ou AMP cíclico) (YAMASHITA, KURODA, 2002).

Funcionalmente, a MDC recruta células dendríticas, células *natural killers* (NK) e as próprias células Th2 (MANTOVANI et al, 2000; YAMASHITA, KURODA, 2002)

A MDC é altamente expressa em lesões de doenças relacionadas aos linfócitos Th2, como a hipersensibilidade das vias aéreas e a dermatite atópica, desempenhando um papel importante no recrutamento das próprias células Th2 para os locais da reação inflamatória e na regulação das respostas imunitárias relacionadas com este perfil Th (MONTESEIRÍN, 2002).

Destaca-se que em altas concentrações, a MDC desencadeia um *respiratory burst*, que gera espécies reativas de oxigênio (MONTESEIRÍN, 2002).

### 2.4.2 Interleucina 10

A IL-10 é também conhecida como fator inibidor de citocinas humanas (CSIF), é considerada uma citocina anti-inflamatória imunomodulatória produzida pelas células T CD8 ativadas. Atua nos macrófagos como fator desativador de macrófago produzindo efeitos inibitórios nas células T e NK (BORISH, 2003; JOHN et al, 1998).

Funcionalmente, a IL-10 regula crescimento e/ou diferenciação de células B, granulócitos, células dendríticas, neutrófilos, queratinócitos e células endoteliais de modo a inibir resposta contra patógenos intracelulares. Sua maior ação é na inibição de Th1 e diferenciação de sobrevivência de eosinófilos na hiperresponsividade das vias aéreas, além de inibir produção/síntese de  $IFN\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-10,  $TNF\alpha$  e suspende a apresentação ao antígeno (BORISH, 2003; JOHN et al, 1998).

Em humanos, a IL-10 é produzida por células Th0, Th1 e Th2 ativadas por monócitos, mastócitos e macrófagos. No pulmão normal, os macrófagos alveolares são a principal fonte de IL-10. No padrão Th2 clássico da asma alérgica os níveis de IL-10 encontram-se aumentados, mas sua expressão significativamente reduzida nesta condição patológica também sendo relatada na literatura, provavelmente associada a desvios de perfil Th (BORISH, 2003; JOHN et al, 1998).

### 2.4.3 Interleucina 17

O papel da IL-17 no processo de imunorregulação das doenças pulmonares ainda é um assunto recente. De forma semelhante, como descrito anteriormente, nos pulmões sua diferenciação está ligada a IL-6, IL21 e  $TGF\beta$  em camundongos e através

de IL-6 e IL-1 $\beta$  em humanos. Da mesma forma, há dependência de IL-23 para diferenciação (HOLT et al, 2008)

As recentes descrições do papel da IL-17 na inflamação nas vias aéreas apontam para o envolvimento com a fisiopatologia da asma severa e doença pulmonar obstrutiva crônica. Quando liberada pelas células Th17 agem sobre o epitélio das vias aéreas, para liberar ligante CXC-quimiocina 1 (CXCL1), CXCL8 e IL-6. Os dois primeiros ligantes atraem neutrófilos, enquanto a IL-6 aumenta a ativação das próprias células Th17, em um mecanismo de *feed back* (BARNES, 2008; HAMMAD, LAMBRECHT, 2008; HOLGATE et al, 2008).

As células Th17 também liberam IL-21 que estimula a diferenciação das próprias células Th17 em um mecanismo mecanismos de *feed back* positivo (sinalização autócrina), envolvendo o fator de transcrição *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). Com a liberação de IL-22 as células Th17 induzem a liberação de IL-10 e proteínas de fase aguda.

A regulação das células Th17 ocorrem via IL-23, através da ativação do fator de transcrição *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- $\gamma$ t* (ROR $\gamma$ t). Interessantemente em humanos, o TGF $\beta$  parece ter um papel inibitório sobre as células Th17 quando envolve o processo inflamatório das vias aéreas (LI et al.; 2011; ST JOHN et al, 2013).

Vock e colaboradores (2010) identificaram o aumento de células Th17 em biópsias de brônquios de pacientes com asma severa e os autores relatam que seria correto considerar que aproximadamente 20% do infiltrado linfocitário na asma corresponde às células Th17 (VOCK et al, 2010).

A hipótese de que as células Th17 tem um papel importantena asma vem do fato de que foi demonstrado que estas células, *in vitro*, produzem IL-8, IL-6, TNF $\alpha$ , fator de crescimento de colônias de granulócitos e monocitos (GM-CSF), e fator de



crescimento relacionado ao antígeno  $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ) em células epiteliais de humanos e células da musculatura lisa bronquial através da secreção de IL-17A e IL-17F (VOCK et al, 2010).

As células Th17 ativam neutrófilos através da IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A, que atuam em sinergia na produção e atividade de elastase neutrofílica humana (HNE) e mieloperoxidase, duas das mais importantes enzimas derivadas de neutrófilos. As células Th17 prolongam a sobrevivência de neutrófilos liberando GM-CSF e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), permitindo-lhes a manutenção da sobrevivência dos neutrófilos nas vias aéreas (LI et al.; 2011; ST JOHN et al, 2013).

#### 2.4.4 Interleucina 22

A IL-22 é membro da família IL-10 e subfamílias IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-29 e se liga a receptores de superfície IL-10R2 e IL-22R1, pertence à classe dos potentes mediadores inflamatórios (OUYANG et al, 2011).

São produzidas pelas células TCD4+, TCD8+ e células NK onde se inicia a resposta imune inata contra agentes patogênicos, bacterianos, células epiteliais do aparelho respiratório e intestinal (GERHARDT et al, 2009; SABAT et al, 2014).

Juntamente com IL-17, a IL-22 é produzida por células Th17 e tem papel importante na regeneração dos tecidos em reações de autoimunidade, porém, esta interleucina pode ter ação pró-inflamatória e também reguladora da co-expressão da IL-17 (SABAT et al., 2014; CRELLIN et al, 2010).

Estudos sugerem que em modelos animais de camundongos, as células Th17 são as principais produtoras de IL-22, fato que difere dos seres humanos onde sua

produção advém principalmente das células Th22 e Th1 (SABAT et al., 2014; WOLK et al, 2011).

## 2.5 Modelos animais no estudo da fisiopatologia da asma

A fisiopatologia da asma tem sido frequentemente estudada em modelos experimentais que utilizam animais. Este fato ocorre, provavelmente, pelas limitações de estudos com seres humanos por questões éticas, principalmente quando há a necessidade de realização de procedimentos invasivos ou não se tem conhecimento prévio da eficácia e toxicidade *in vivo* do objeto de estudo (GUEDERS et al, 2009).

A utilização de camundongos é a principal escolha para a indução experimental da asma pois estes animais se reproduzem e amadurecem em rápido ciclo; ainda, há ampla disponibilidade de reagentes e marcadores da resposta imune para este modelo (GUALDI, 2010). Destaca-se que especificamente camundongos da linhagem BALB/c desenvolvem inflamação pulmonar semelhantemente aos humanos, apresentando intenso recrutamento de mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, hipersecreção de muco, hiperresponsividade das vias aéreas, aumento da produção de IgE específica nos modelos induzidos por ovalbumina (OVA) e aumento da expressão de IL-4, IL-5, IL-13 (GUEDERS et al, 2009).

Além desses fatores, em modelos experimentais há maior controle sobre variáveis intervenientes que atualmente são descritas como determinantes e afetam diretamente o fenótipo da asma, tais como: a dieta e principalmente fatores ambientais relacionados à higiene. O controle do ambiente experimental aumenta a probabilidade de um microbioma comum à colônia, minimizando interferências sobre a resposta imunológica (EDWARDS et al, 2012).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, desenvolvidos no modelo clássico de asma induzida por OVA em camundongos BALB/c, sugerem que o estresse oxidativo induzido por hiperóxia aumenta a IL-17 em células epiteliais das vias aéreas, células alveolares do tipo II e macrófagos após indução em modelo experimental de asma por ovalbumina (NAGATO et al, 2015).

Nagato e colaboradores (2015) observaram que a hiperoxia promove a polarização da resposta imune em direção ao fenótipo Th17, resultando em dano tecidual associado ao estresse oxidativo e migração de neutrófilos para o pulmão e vias aéreas.

Dada a relevância da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos para prevenir e tratar pacientes asmáticos graves e em crise que necessitam de suplementação de oxigênio para reverter a hipoxemia, o presente trabalho busca elucidar os mecanismos pelos quais a hiperóxia leva a lesões pulmonares na inflamação aguda das vias aéreas, em modelo experimental de asma induzida pela OVA.

### **3 HIPÓTESE**

A hiperóxia promove modificações no perfil clássico de resposta Th2 no modelo de asma aguda em camundongos promovendo alterações nas características imunológicas e inflamatórias no processo alérgico.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Verificar os mecanismos imunológicos pelos quais a hiperóxia leva a lesões em vias aéreas inferiores e parênquima pulmonar em modelo de asma experimental induzida por OVA em camundongos BALB/c.

### 4.2 Objetivos específicos

Caracterizar, histopatologicamente, o infiltrado inflamatório e o colágeno em áreas peritubulares e perivascularares, bem como a presença de muco no epitélio brônquico, em amostras de tecido pulmonar

Analisar os níveis de IL-22, IL-17 e IL-10 em lavado broncoalveolar

Analisar os níveis de nitrito (NO<sub>2</sub>) em lavado broncoalveolar

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo analítico experimental foi realizado em parceria entre as Universidades Federais de Juiz de Fora (UFJF) e Ouro Preto (UFOP), ambas do Estado de Minas Gerais, e foi submetido à Comissão de Ética para o uso de animais experimentais da UFOP, protocolo CEUA no. 107/2012 (ANEXO 1).

As etapas experimentais foram realizadas nas duas instituições mencionadas, sendo: na UFOP (procedimento experimental, coleta e obtenção de amostras, análise imuno-histoquímica) e na UFJF (análise histopatológica, obtenção e análise dos resultados e análise estatística).

### 5.1 Animais

O estudo apresentado foi realizado com blocos provenientes de 30 camundongos BALB/c isogênicos (n=30), fêmeas, com idade variando entre seis a oito semanas, pesando cerca de 20-25g. Os animais que deram origem ao material emblocado foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP/MG – Brasil, onde a pesquisa experimental foi realizada. Os animais foram mantidos à uma temperatura controlada ( $21-22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa do ar entre 50-55% (Termo-Higrômetro Digital  $-50^{\circ} + 70^{\circ}\text{C}$  910.15chp Allabrazil), com ciclo de iluminação de 12h claro X 12h escuro, com início do ciclo de luz fluorescente a partir das 7h; foram alimentados com ração e água (mamadeira) *ad libitum*. O ambiente foi exaurido a cada 15 minutos, mediante sistema automático controlado por *timer*.

Durante a fase de exposição ao oxigênio/nebulização (descrita a seguir), mamadeiras de 60ml foram posicionadas internamente à câmara de inalação,

juntamente com ração triturada em cochos para viabilizar e facilitar a alimentação dos animais.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

1. Grupo Controle (n=6) – contendo seis animais que ficaram ao ar ambiente e não sofreram quaisquer tipos de intervenções.

2. Grupo PBS + Al(OH)<sub>3</sub> (n=6) – englobando seis animais que ficaram ao ar ambiente. No primeiro (1<sup>o</sup>.) e no décimo quarto dia (14<sup>o</sup>. dia) do experimento receberam injeção intraperitoneal com tampão fosfato (PBS+Al(OH)<sub>3</sub>), no vigésimo oitavo (28<sup>o</sup>.), vigésimo nono (29<sup>o</sup>.) e trigésimo dia (30<sup>o</sup>. dia) do experimento tampão fosfato intranasal e no trigésimo segundo dia (32<sup>o</sup>. dia) foram submetidos a metacolina nebulizada.

3. Grupo OVA (n=6) – englobando seis animais que ficaram em ar ambiente, receberam injeção intraperitoneal com ovalbumina (OVA) no primeiro (1<sup>o</sup>.) e no décimo quarto dia (14<sup>o</sup>. dia) do experimento. Foram sensibilizados com ovalbumina intranasal (PBS diluído em Al(OH)<sub>3</sub>) no vigésimo oitavo (28<sup>o</sup>.), vigésimo nono (29<sup>o</sup>.) e trigésimo dia (30<sup>o</sup>. dia) do experimento, conforme procedimento descrito a seguir. Posteriormente, no trigésimo segundo dia (32<sup>o</sup>. dia) foram submetidos a metacolina nebulizada.

4. Grupo O<sub>2</sub> (n=6) – englobando seis animais que ficaram em ar ambiente e no trigésimo segundo dia foram expostos ao oxigênio por 24 horas.

5. Grupo OVA + O<sub>2</sub> (n=6) – englobando seis animais que ficaram ao ar ambiente, no primeiro (1<sup>o</sup>.) e décimo quarto dia (14<sup>o</sup>. dia) do experimento receberam injeção intraperitoneal de ovalbumina. No vigésimo oitavo (28<sup>o</sup>.), vigésimo nono (29<sup>o</sup>.) e trigésimo dia (30<sup>o</sup>. dia) foram sensibilizados com ovalbumina intranasal (PBS diluído em Al(OH)<sub>3</sub>), conforme procedimento

descrito a seguir. No trigésimo segundo dia (32º. dia) foram submetidos a metacolina nebulizada seguido de exposição imediata ao oxigênio por 24 horas.

## 5.2 Indução experimental da asma

### 5.2.1 Sensibilizados com OVA intraperitoneal e/ou injeção de PBS diluído em Al(OH)<sub>3</sub>

No primeiro dia (1º.dia) do experimento foram injetadas intraperitonealmente (IP) nos camundongos do Grupo PBS, no Grupo OVA e no Grupo OVA + O<sub>2</sub>, respectivamente, um volume final de 50µL de solução de PBS em 2mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) e 20mg de OVA por camundongo. No décimo quarto dia (14º. dia) do experimento este procedimento foi repetido.

### 5.2.2 Instilação intranasal com OVA ou PBS e nebulização com metacolina ou PBS

No vigésimo oitavo (28º.), vigésimo nono (29º.) e trigésimo dia (30º. dia) do experimento, os animais dos grupos OVA e OVA+O<sub>2</sub> receberam volume final de 50µL de solução de 20mg de OVA em 2mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) nebulizados (Inalador a Ar Comprimido - INALAR-COMPACT) durante 20 minutos cada dia. O Grupo PBS, recebeu apenas o mesmo volume de PBS nebulizado.



No trigésimo segundo dia (32<sup>o</sup>. dia), os animais dos Grupos OVA e OVA+O<sub>2</sub> foram submetidos à nebulização com concentração de 25mg/ml de metacolina (adaptado de Kumar, 2008).

### 5.3 Modelo de exposição ao oxigênio

Os animais dos grupos O<sub>2</sub> e OVA+O<sub>2</sub> foram expostos a condições de hiperóxia em uma câmara de inalação (30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 15 cm de altura) (Valenca, et al., 2007; Nagato, et al., 2009; Nagato, et al., 2012) e receberam um fluxo de oxigênio contínuo de 10l/min, por 24 horas, após o desafio com metacolina.

Dois cilindros de oxigênio medicinal (oito mil litros de O<sub>2</sub>/cilindro obtidos da empresa White Martins Praxair Inc. São Paulo, Brazil) foram acoplados a uma válvula reguladora de pressão e um fluxômetro (com amplitude de mensuração de 0-15L/min). Um condutor de silicone conectado ao fluxômetro a câmara de inalação. Os animais dos grupos acima foram colocados na câmara no trigésimo segundo dia (32<sup>o</sup>. dia) do experimento com exposição por 24 horas; logo após o término de exposição foi realizado a eutanásia dos animais.

### 5.4 Eutanásia

Os animais foram sedados com Ketamina (100mg/Kg) e Xylazina (15mg/Kg) e apoiados sobre a grade das gaiolas, de tal forma que pudessem se agarrar, propiciando firmeza durante o método. A cauda do animal foi segurada com uma das mãos (pela base) e a outra apoiada com uma pinça anatômica transversalmente sobre

a região cervical. A seguir, a pinça foi pressionada firmemente para baixo e para frente, empurrando a cabeça do animal, enquanto que, simultaneamente, a cauda foi tracionada em sentido oposto, para trás. Foram aguardados os movimentos reflexos musculares involuntários para deslocamento cervical dos animais, para a remoção dos órgãos e amostras para as análises.

### 5.5 Obtenção das amostras

Após a eutanásia dos animais, uma incisão cirúrgica na linha média foi realizada do processo xifóide até cerca de dois centímetros inferiormente, para que seja rebatido o epitélio lateralmente, e o fígado seja exposto. Após rebater o fígado inferiormente e desinsere o músculo diafragma, foi realizada toracotomia esquerda e direita, e as costelas foram rebatidas superiormente para exposição anatômica dos pulmões e coração. Os pulmões foram coletados após desinserção das estruturas anatômicas adjacentes, através do pinçamento do mediastino, de tal forma que os pulmões não fossem manipulados diretamente. Os órgãos foram mantidos por 48 horas imersos em formalina 4% tamponada, na proporção de 20 vezes o volume de formalina para o volume de amostra.

Para obtenção do lavado broncoalveolar, os pulmões e vias aéreas dos animais foram lavados três vezes com 500 $\mu$ L (volume final igual 1,2 – 1,5ml). Em seguida, 500 $\mu$ L foram utilizados imediatamente para contagem total de células mononucleares e polimorfonucleares através da Zi Coulter Counter (Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA) e o volume restante foi estocado em gelo para análises bioquímicas posteriores.

## 5.6 Processamento histológico das amostras

Após a fixação, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 hora cada, sendo feitos três banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em três banhos em xilol de uma hora cada, e finalmente realizada a impregnação em parafina em estufa a 58°C e a inclusão na parafina a temperatura ambiente. Os blocos foram então cortados em micrótomo modelo “820” Spencer com espessura de 5µm para colorações de rotina e análises histoquímica e imuno-histoquímicas.

Os cortes foram desparafinados em três trocas de xilol (dois minutos cada) e hidratados em soluções de etanol com concentrações decrescentes com duas trocas a 100%, uma a 90% e uma a 70% (dois minutos em cada troca) e lavados em água destilada.

Foi realizada a coloração de rotina hematoxilina e eosina (HE), que cora os núcleos em roxo / azul escuro (basofílicos) e o citoplasma em vermelho/róseo (eosinofílicos) (ANEXO 2).

Ainda, foi realizada a coloração histoquímica tricrômio de Gomori para observar a organização do colágeno nas áreas peritubulares e perivasculares, bem como caracterização do infiltrado inflamatório nas mesmas regiões; o colágeno é destacado em coloração verde (ANEXO 3). Para a observação da presença de mucopolissacarídeos (corados em púrpura/magenta) no epitélio brônquico, foi utilizada a coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (5µm de espessura) (ANEXO 4).

### 5.7 Análise histopatológica

Os cortes corados em HE e nas colorações histoquímicas foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 200X e 400X em toda sua extensão. A análise foi realizada em toda a extensão do corte por três diferentes observadores com formação em patologia e morfologia. A partir desta avaliação, foram selecionadas, em aumento de 400x, dez campos em cada amostra para captura digital por sistema computadorizado Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), por meio de câmera digital acoplada a microscópio óptico. Foram avaliadas descritivamente as características gerais da histomorfologia bem como a densidade das fibras colágenas, características do infiltrado inflamatório e presença de muco em epitélio, nas amostras do experimento.

### 5.8 Homogeneizado pulmonar

O pulmão direito foi adicionado ao tubo de hemólise contendo 1ml de tampão fosfato, e homogeneizado utilizando um homogeneizador de tecidos. Em seguida, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 7500rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -86°C para realização de imunoenensaio (ELISA) e análises bioquímicas (dosagem de nitrito) e o pellet foi descartado (ANEXO 5).

Para a análise dos dados foi preparada uma curva padrão baseado nos dados produzidos a partir de diluições em série e a concentração da amostra foi analisada com base nesta curva padrão.

## 5.9 Análise estatística

Após confirmação do teste de normalidade (*Gaussian approximation*) os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. A diferença entre os dados contínuos dos grupos foi avaliada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do Pós-teste de *Tukey*. A diferença entre os dados discretos dos grupos foi realizada através do Teste *Kruskal-Wallis* seguido do Pós-teste de *Dunn*. Em ambos os casos, diferença significativa foi considerada quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05 (*Graphpad Prism 5 Software*).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão serão apresentados sob forma de artigos.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados sugerem que a polarização para o fenótipo Th17 induzida pela hiperóxia é acompanhada da redução de macrófagos, menores níveis de IL-10 e maior expressão de IL-22.

## REFERÊNCIAS

1. Aggarwal P, Bhoi S. Comparing the efficacy and safety of two regimens of sequential systemic corticosteroids in the treatment of acute exacerbation of bronchial asthma. *J Emerg Trauma Shock*, 3(3):231-7, 2010.
2. Alaverdi N, Sehy D. Cytokines - Master Regulators of the Immune System. *eBioscience*. [www.thermofisher.com/](http://www.thermofisher.com/) 2007.
3. ASBAI. Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. [www.asbai.com.br](http://www.asbai.com.br) / 2018.
4. Barnes, P J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8(3): 183-92, 2008.
5. Ben Menachem-Zidon O, et al. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain, Behaviour and Immunity* 25 (5): 1008- 16, 2010.
6. Bhandari V, Elias JA. Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung. *Free Radic Biol Med* 41(1): 4-18, 2006.
7. Borish L. Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol* 112(6): 1021-31, 2003.
8. Carvalho RM, et al. Exhaled nitric oxide and quality of life in asthmatic teenagers. *WAO* 8 (1): 1, 2015.
9. Colice GL. Categorizing Asthma Severity: An Overview of National Guidelines. *Clin Med Res* 2(3): 155-63, 2004.



10. Crellin NK, et al. Human NKp44+IL-22+ cells and LTI-like cells constitute a stable RORC+ lineage distinct from conventional natural killer cells. *J Exp Med* 207(2): 281-90, 2010.
11. Edwards MRN, et al. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol* 10(7): 459-71, 2012.
12. Galli SJ, et al. The development of allergic inflammation. *Nature* 454(7203): 445-54, 2008.
13. Geller M. Vias aéreas unidas: a atopia como processo sistêmico e contínuo *Rev bras alerg imunopatol* 25(3): 74-80, 2002.
14. Gerhardt S et al. Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody. *J Mol Biol* 394(5): 905- 21, 2009.
15. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2015.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015.pdf). 20th May 2015.
16. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2017.
17. Gualdi LP. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. *Scientia Medica* 20(3): 236-42, 2010.
18. Gueders M, et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res* 58(12): 845-54, 2009.
19. Guerreiro R, et al. As quimiocinas e os seus receptores. *Acta Med Port* 24(S4): 967-76, 2011.

20. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8(3): 193-204, 2008.
21. Holgate Set, al. The Brussels Declaration: the need for change in asthma management. *Eur Respir J* 32(6): 1433-42, 2008.
22. Holt PG, et al. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 8(2): 142-52, 2008.
23. Jin T, et al. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44(1): 1-8, 2008.
24. John M, et al. Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(1): 84-90, 1998.
25. Jungsuwadee P, et al. The metalloporphyrin antioxidant, MnTE-2-PyP, inhibits Th2 cell immune responses in an asthma model. *Int J Mol Sci* 13(8): 9785-97, 2012.
26. Korn T, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells. *Nature* 448(7152): 484-7, 2007.
27. Leite RMS, Carvalho Costa IZ. Dermatite atópica: uma doença cutânea ou uma doença sistêmica? A procura de respostas na história da dermatologia. *An Bras Dermatol* 82(1): 71-8, 2007.
28. Li Z, et al. A potential role of the JNK pathway in hyperoxia-induced cell death, myofibroblast transdifferentiation and TGF-beta1-mediated injury in the developing murine lung. *BMC Cell Biol* 12: 54, 2011.
29. Liu AH et al. Pathways through which asthma risk factors contribute to asthma severity in inner-city children. *J Allergy Clin Immunol* 138(4): 1042-50, 2016.

30. Mantovani A, et al. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 68(3): 400-4, 2000.
31. Matute-Bello G, et al. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L379–L399, 2008.
32. Mellado M, et al. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19: 397-421, 2001.
33. Monteseirín J. Respiratory burst in neutrophils from asthmatic patients. *J Asthma* 39(7): 619-24, 2002.
34. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Ver Immunol* 7: 145–73, 1989.
35. Nagato AC, et al. Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. *Int J Exp Pathol* 93(4): 269-78, 2012.
36. Nagato AC, et al. Hyperoxia promotes TH cell polarization in airway inflammation. *Immunity, Inflammation and Disease* 3(3): 321- 37, 2015.
37. Nagato AC, et al. Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. *Exp Lung Res* 35(8):713-28, 2009.
38. OMS, Ministério da Saúde. <http://portalms.saude.gov.br/2015>.
39. Oppmann B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13(5): 715-25, 2000.
40. Ouyang W, et al. Regulation and Functions of IL-10 Family Cytokines in Inflammation and Diseases. *Annu Rev Immunol* 29: 71-109, 2011.

41. Palomino DC, Marti LC. Quimiocinas e imunidade. *Einstein* 13(3): 469-73, 2015.
42. Park H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol* 6(11): 1133–41, 2005.
43. Perrin, K et al. Randomised controlled trial of high concentration versus titrated oxygen therapy in severe exacerbations of asthma. *Thorax* 66(11): 937-41, 2011.
44. Rajagopalan L, Rajarathnam K. Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci Rep* 26(5): 325-39, 2006.
45. Regateiro F, et al. Novos biológicos para o tratamento da asma. *Rev Port Imunoalergologia* 25(2): 99-113, 2017.
46. Rossi D, Zlotinka A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18: 217-42, 2000.
47. Rubin AS, et al. Hiperresponsividade brônquica. *J Pneumol* 28(S3): 101-21, 2012.
48. Sabat R, et al. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov* 13(1):21-38, 2014.
49. Santo AH. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. *Cad. Saúde Pública* 22(1):41-52, 2006.
50. Shi YY et al. Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Inflamm Res* 61(12): 1369-78, 2012.
51. Soldevila G, García-Zepeda E.A. The role of the Jak-Stat pathway in chemokine-mediated signaling in T lymphocytes. *Signal Transduct* 7: 427-38, 2007.

52. St John AL, Soman NA. Innate Immunity and its Regulation by Mast Cells J Immunol 190(9): 4458-63, 2013.
53. Valenca Sdos S, et al. Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs. J Bras Pneumol 33(6): 655-62, 2007.
54. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. Nat Rev Immunol 8(3):169-82, 2008.
55. Vock C, et al. The other T helper cells in asthma pathogenesis. J Allergy 210: 519298, 2010.
56. Wehrmeister FC, et al. Tendência temporal de asma em crianças e adolescentes no Brasil no período de 1998 a 2008. Rev Saúde Pública 46(2): 242-9, 2012.
57. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. Nat Med 18(5): 716-25, 2012.
58. Wolk K, et al. Deficiency of IL-22 contributes to a chronic inflammatory disease: pathogenetic mechanisms in acne inversa. J Immunol 186: 1228-39, 2011.
59. Yamashita U, Kuroda E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. Crit Rev Immunol 22(2): 105-14, 2002.
60. Yao Y, et al. Low doses of exogenous interferon-gamma attenuated airway inflammation through enhancing Fas/FasL-induced CD4+ T cell apoptosis in a mouse asthma model. J Interferon Cytokine Res 32(11): 534-41, 2012.
61. Zhu J, Paul WE. CD4 T Cells: Fates, Functions, and Faults. Blood 112(5): 1557-69, 2008.

**APÊNDICE 1: Ofício CEUA****MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: [ceua@propp.ufop.br](mailto:ceua@propp.ufop.br)**OFÍCIO CEUA Nº. 107/2012, de 10 de outubro de 2012.****Ilmo. Sr.****Prof. Dr. Frank Silva Bezerra****DECBI/ICEB/UFOP**

Senhor Pesquisador,

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo "*Efeitos da hiperóxia sobre a resposta inflamatória imunológica de camundongos BALB/C no modelo de asma aguda*". Informamos também que para atender a resolução normativa nº. 1, artigo 6º, do CONCEA, ao final da execução do mesmo deverá ser encaminhado relatório à CEUA/UFOP, conforme modelo presente na página da CEUA.

Atenciosamente,

*Wanderson Geraldo de Lima*  
**Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima**  
Coordenador da CEUA/UFOP.

## **APÊNDICE 2: Hematoxilina e eosina (HE)**

### Hematoxilina e eosina (HE)

Após a hidratação, os tecidos foram corados durante 15 minutos pela Hematoxilina de Harris: 5 g de hematoxilina dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto e 100 g de alúmen de amônio ou potássio em 1000 mL de água destilada aquecida misturaram-se as duas soluções, deixar ferver, em seguida adicionado 2,5 g de óxido de mercúrio, reaquecido até tornar-se púrpuro escuro; será retirada do aquecimento e esfriada rapidamente. Foram adicionados 2 a 4 mL de ácido acético glacial por 100 mL de solução, filtrado antes do uso e o material foi lavados e azulados em água corrente por 5 minutos e água amoniacal (200mL de água destilada com 3 gotas de hidróxido de amônio), corados pela solução de eosina aquosa 1% durante 2 minutos e diferenciados em etanol a 70%.

**APÊNDICE 3: Coloração histoquímica tricrômio de Gomori***Coloração histoquímica tricrômio de Gomori*

As lâminas com os cortes aderidos passaram pelas etapas:

- 1.- 2x10 min em xilol para desparafinar.
- 2.- 2x10 min em 100° etanol
- 3.- 10 min em etanol a 96°
- 4 a 10 min em etanol a 80°
- 5.- 10 min em etanol a 50°
- 6 - 5 min em água destilada.
- 7.- 1h em solução Bouin 24h à temperatura ambiente
- 8.- Banho em água destilada até que a cor amarela desapareça
- 9.- 10 min na hematoxilina de Weigert.
- 10.- 5 - 10 min em água corrente.
- 11.- 15 min em solução de tricrômio.

Solução tricrômica:

0,6 g de crômio 2R (CI 16570).

0,3 g de luz verde (CI 42095).



0,8 g de ácido fosfotúngstico.

1 ml de ácido acético glacial.

Até 100 ml de água destilada.

12- 1min em ácido acético a 1%.

13.- 30s em água destilada

14.- 1 min em 100° etanol

15.- 1 min em 100° etanol

16.- 2 min em xileno

16.- 3 min em xileno

17.- Montagem do corte corado com lamínula fixada com entelan.

**APÊNDICE 4: Método do ácido periódico reativo de Schiff (PAS)***Método do ácido periódico reativo de Schiff (PAS)*

- 1 - Desparafinizar e hidratar os cortes em destilada.
- 2- Colocar as lâminas na solução de ácido periódico 1% por 15 min
- 3- Lavar em água destilada por 5 min
- 4- Corar pela solução Schiff por 15 min em temperatura ambiente.
- 5- Colocar em solução sulfurosa durante 5 min
- 4 - Envolver o recipiente com as lâminas em papel alumínio ou colocar em câmara escura
- 5 - Lavar em água destilada por 4 minutos.
- 6- Corar pela hematoxilina de Mayer durante 10 min
- 7- Lavar em água corrente durante 5 minutos.
- 8- Desidratar e realizar a montagem do corte corado com lamínula fixada com entelan.

## APÊNDICE 5: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)*

### *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)*

#### ETAPA 1: Revestimento da microplaca com antígeno

1. Dilui-se o antígeno (amostra de sangue e homogeneizado pulmonar) a uma concentração final de 20µg/ml em PBS. Em seguida, os poços da placa de ELISA (placa de 96 poços) foram revestidos com 50µl da solução antígeno/PBS, por pipetagem.
2. A placa foi coberta com plástico adesivo, e incubada durante 2h, à temperatura ambiente, ou à 4°C durante o *overnigth*.
3. A solução de revestimento foi removida e a placa lavada três vezes por enchimento dos poços com 200µl de PBS+wash buffer. As soluções ou lavagens foram removidas por *flicking* sobre uma pia. As gotas restantes removidas por *patting* sobre uma toalha de papel.

#### ETAPA 2: Bloqueio

4. Os locais restantes de ligação de proteínas dos poços revestidos foram bloqueados por adição de 300µL de tampão de bloqueio por poço para evitar reações inespecíficas. Este tampão foi realizado com 5% de BSA (bovine serum albumin/ soro bovino fetal) a fim de equilibrar as soluções.
5. A placa foi coberta com um plástico adesivo e incubada durante pelo menos 2h à temperatura ambiente ou a 4°C em *overnigth*.
6. Lave a placa duas vezes com PBS.

ETAPA 3: Incubação com anticorpo primário (anti IL-10, IL-17, IL-22 e MDC) e secundário

7. Foi adicionado 25µl de anticorpo primário diluído para 10mL em cada poço.
8. A placa foi coberta com um plástico adesivo e incubada durante 2h à temperatura ambiente, ou a 4 ° C em *overnight*.
9. A placa foi lavada quatro vezes com PBS+ solução de tween.
10. Foi adicionado 25µl de anticorpo secundário conjugado, diluído de acordo com a concentração (sugerido pelo fabricante) em tampão de bloqueio imediatamente antes da utilização.
11. A placa foi coberta com um plástico adesivo e incubada durante 1-2h à temperatura ambiente.
12. A placa foi lavada quatro vezes com PBS+solução de tween.

ETAPA 4: Anticorpo de Detecção

13. A solução foi bloqueada com 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol (para a peroxidase).
14. Avidina por 30 minutos
15. Substrato ABTS por 30min – cromógeno

O substrato para a ABTS é o peróxido de hidrogénio. A clivagem de peróxido de hidrogénio é acoplado a oxidação de um doador de hidrogênio que muda de cor durante a reação com coloração esverdeada a análise no espectrofotômetro.

16. Foi pipetado 100µl da solução do substrato, por poço.

Após o desenvolvimento de cor suficiente foi realizada a leitura da absorbância (densidade óptica) de cada poço com o leitor de placas, no espectrofotômetro.

## APÊNDICE 6: Carta de Aceite



ADMINISTRAÇÃO	ENFERMAGEM	ENFERMAGEM	CIÊNCIAS
BIOMEDICINA	EDUCAÇÃO FÍSICA	PSICOMOTRICIDADE	PSICOMOTRICIDADE
COMUNICAÇÃO	ENFERMAGEM DE FUNDAMENTOS	PSICOMOTRICIDADE	PSICOMOTRICIDADE
DESAFIO	PSICOMOTRICIDADE	PSICOMOTRICIDADE	PSICOMOTRICIDADE

## CARTA DE ACEITE

Rio de Janeiro, 18 de julho de 2018

Prezado Fernando Monteiro Aarestrup,

Informo que o artigo "As células th17 e seu papel na fisiopatologia da asma", foi aceito pelo comitê científico da revista científica Ciência Atual e será publicado na edição de janeiro de 2019.

Cordialmente,

Prof. Dr. Amando Hayassy  
Editor Gerente