

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE - CCS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - TCC
CURSO DE FARMÁCIA

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DA
SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS
NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

JOÃO PESSOA – PB

2018

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

**IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA
ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS NO LABORATÓRIO DE
IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

JOÃO PESSOA – PB

2018

F383i Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva.

Implantação do modelo experimental da síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas no laboratório de imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba / Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira. - - João Pessoa, 2018.

88p: il. -

Orientadora: Marcia Regina Piuvezam.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. CARAS. 2. Laboratório de Imunofarmacologia. 3. Implantação. 4. Alergia.
5. Ovalbumina. 6. Farmácia.

BS/CCS/UFPB

CDU: 616.211-002+616.248(043.2)

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

**IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA
ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS NO LABORATÓRIO DE
IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Farmácia do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

APROVADO em ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (**Orientadora**)
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

Profa. Dra. Daniele Idalino Janebro Ximenes (Examinadora)
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

Profa. Dra. Isabele Beserra Santos Gomes (Examinadora)
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)

*A minha melhor amiga, chefe, conselheira, colega de profissão
e maior orgulho, minha irmã amada Laércia, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A maior gratidão ao Dono da vida, ao Autor e Consumador da minha fé, Príncipe da Paz e amigo fiel, DEUS, por ser meu auxílio bem presente, fortaleza inefável, cuidador em todo o tempo. És a fonte de inspiração e preparastes cada momento da minha vida até aqui, colocando sempre as pessoas certas, situações adequadas e me ensinas em todas as ocasiões.

Aos meus genitores, pais amados, **Luiz Carlos de Souza Ferreira** e **Clélia Paiva da Veiga**, vocês são minha base, meu alicerce, meu fundamento. Tudo é por vocês e para vocês, os melhores pais do mundo! Painho, meu exemplo de trabalhador, batalhador, que sempre proveu tudo em nosso lar. Mainha, melhor MÃE do mundo, minha amiga, minha companheira em TODOS os momentos e que sempre segura minha mão, seja qual for a situação. Minha voinha linda **Maria Alves de Souza Ferreira**, parceira desde a infância e que me ensina e “puxa tanto as orelhas”, um amor imensurável por ti, sinto. Àquela maior fonte de segurança e cuidado, minha irmã **Laércia Karla Diega Paiva Ferreira**, obrigada por compartilhar sua vida comigo, somos irmãs de sangue, de almas, de fé, de profissão. Você é o meu maior orgulho e cada palavra aqui é dedicada a ti, por me ensinar sempre (nem sempre de bom humor) a ser melhor. Não tem alguém que mais me entenda do que você, minha AMIGA. E também, a **Romero**, por todo suporte e ajuda necessários. E a nossa gatinha linda, **Daphynne**, por ser a alegria da nossa casa.

Aos meus tios e tias, primos e primas, em especial **Thiala** e **Clélia (Flor)**, vocês contribuem sempre, como também a minha tia **Mariinha**, por me amar tanto e ser minha “segunda mãe”, te amo muito. Também minhas tias **Raquel**, **Socorro Paiva** e **Socorro Martins**. São exemplos para mim.

Ao meu **Pastor Mano e Rinalda**, por me ajudarem em oração e sempre com uma palavra de conforto e paz ao meu coração.

A minha AMADA orientadora, **Profa. Dra. Marcia Regina Piuezam**, obrigada por todo carinho, orientação, dedicação, cuidado. A senhora me inspira a ser melhor, me motiva e sou muito grata a Deus por ter o privilégio de compartilhar tantos momentos com a senhora. És um ser humano incrível, honesta, justa, cuidadosa, presente e que é meu maior exemplo profissional. Obrigada por estar sempre disponível para minhas dúvidas e tirá-las do jeito mais cativante e orientador

possível, sorte tem dos que tem suas caminhadas acadêmicas suavizadas pelo seu jeito único e diferenciado de orientar.

Aos membros da Banca Examinadora, **Profa. Dra. Daniele Idalino, Profa. Dra. Isabele Gomes, Profa. Dra. Celidarque Dias e MSc. Talissa Mozzini**. O curso de farmácia não teria sido o mesmo se não fosse o apoio, dedicação e amor que vocês demonstram em cada disciplina ministrada. Estão eternizadas na minha vida e são fontes de inspiração e ética para mim. Vocês são anjos que iluminam a vida daqueles que cruzam os vossos caminhos e transmitem o mais especial da farmácia: o amor. Tenham certeza que cada uma marcou meu coração e sou grata por compartilharem esse momento de conquista comigo.

Ao LIMFA, por todo apoio experimental e de conversas, aos professores **Giciane Vieira, Sandra Mascarenhas e Cláudio Santos**, como também a **Juliane, José Guilherme, Luiz, Marreiro, Larissa R., Bianka, Éssia, Dayse, Anne, Raquel, Allysson, João, Cosmo, Tamires, Hyanka, Viviane, Júlia**, e em especial a EQUIPE TOP: **Laércia, Talissa e Grasiela**. Vocês tornam as madrugadas experimentais mais alegres e me fortalecem e incentivam a crescer. A eterna **amiga Talissa**, entre “amor e ódio” construímos uma linda relação de amizade, obrigada por todo incentivo. A **Crispim e Mônica** por estarem sempre disponíveis em ajudar nos experimentos e na caminhada.

Aos mestres do curso de Farmácia que fazem parte do MELHOR CORPO DOCENTE que já se viu, sobretudo a: **Elisana, Pablo, Fábio, Celidarque, Daniele, Isabele, Bagnólia, Walleri**. Vocês tornam os dias longos e cansativos mais tranquilos, despertam em nós o estímulo pelo estudo e nos incentivam a melhorar em cada obstáculo. Se estou aqui, vocês são parte fundamental da minha carreira, que Deus continue iluminando a cada um e que a luz que brilha em vocês possa estar sempre acesa para iluminar o caminho dos discentes.

Aos meus amigos, presentes que a farmácia me deu, meus FARMALINDOS, **Fernanda, Ana Luiza, Cinthia, Lidiane, Neto, Geovânia, Grasiela, Natália**, obrigada por todos os estudos “no ventinho”, por todo apoio, por segurar nas mãos e saber que juntos conseguiríamos. Vocês são incríveis. Em especial, ao meu **TRIO DE SUPER PODEROSAS, Fernanda e Ana Luiza**, não tem como não agradecer ao maior ensinamento que vocês me passam continuamente: a AMIZADE. Obrigada por serem as melhores amigas que eu poderia ter. A CAPES/CNPq, UFPB e LIMFA pelo apoio financeiro e suporte técnico e por oferecer a infraestrutura necessária para a realização desta pesquisa.

*“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente
descansará.”*

Salmos 91:1

*“Antes que te formasse no ventre te conheci, e antes que saíesses da
madre, te santifiquei; às nações te dei por profeta.”*

Jeremias 1:5

RESUMO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS – *Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) se caracteriza por ser uma única doença das vias aéreas, devido à ligação íntima na gênese de ambas as doenças. Asma e rinite compartilham os mesmos agentes etiológicos, processos inflamatórios e princípios terapêuticos. O presente trabalho teve por objetivo implantar o modelo experimental da CARAS induzido por ovalbumina (OVA), no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) da UFPB. Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados no processo de sensibilização com OVA e para tal, nos dias zero e sete os animais foram sensibilizados, intraperitonealmente, com OVA-V (10µg/2,0mg de hidróxido de alumínio) e desafios com OVA-V (5mg/mL), por instilação nasal, durante três dias consecutivos, em três semanas consecutivas. A partir do 38º dia, os animais foram desafiados com aerossol de OVA-II (5% /30 minutos) por cinco dias consecutivos. No 43º dia, foi realizado o desfecho do protocolo experimental com a coleta do material biológico tais como: lavado nasal (NALF), lavado broncoalveolar (BALF), cabeça, pulmão e sangue para as devidas análises. O desafio com OVA nos animais sensibilizados promoveu aumento significativo ($p < 0,001$) dos sinais clínicos da rinite: fricção nasal e espirros, nas semanas avaliadas (1ª, 2ª, 3ª e 4ª) após os desafios com OVA quando comparado com o grupo Basal. Resultados semelhantes ocorreram nos mecanismos de fricções nasais e espirros após reatividade nasal induzida por histamina (0,1; 1,0; 10; 100; 1000 nmol). As análises dos NALF e BALF demonstraram que os desafios com OVA induziram aumentos significativos ($p < 0,001$) no número de células totais (10^5) inflamatórias quando comparados com os do grupo Basal. No NALF houve aumento percentual ($p < 0,001$) de eosinófilos. Entretanto, no BALF houve aumento no número de células ($p < 0,001$) tais como: eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Na análise dos cortes histológicos no grupo OVA comparada com o Basal na cavidade nasal, observou-se aumento ($p < 0,001$) da migração celular e, no tecido pulmonar observou-se aumento ($p < 0,001$) na migração celular, hiperprodução de muco e remodelamento tecidual demonstrando inflamação tecidual. O grupo OVA apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) de IgE total e IgE OVA-específica; de citocinas (IL4 e IL-13) e diminuição da razão IFN γ /IL-4 quando comparado ao grupo Basal. Entretanto, as concentrações de IFN γ foram diminuídas significativamente ($p < 0,01$) no grupo OVA e não observamos alterações nas concentrações de IL-10 neste grupo. A ativação da p65 NF- κ B foi evidenciada no grupo OVA em detrimento ao grupo Basal. Diante do exposto, concluímos a efetiva implantação do protocolo experimental da CARAS induzido por OVA no laboratório de Imunofarmacologia/UFPB, podendo assim, ser utilizado para testar novas moléculas no tratamento desta Síndrome.

Palavras chaves: CARAS; Laboratório de Imunofarmacologia; implantação; alergia; ovalbumina.

ABSTRACT

The Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome (CARAS) is characterized by being a unique disease of the airways, due to the intimate connection in the genesis of both diseases. Asthma and rhinitis share the same etiologic agents, inflammatory processes and therapeutic principles. The present study aimed to implant the experimental model of CARAS induced by ovalbumin (OVA), in the Laboratory of Immunopharmacology (LIMFA) / UFPB. Female BALB / c mice were used in the OVA sensitization process and, on days zero and seven, the animals were sensitized intraperitoneally with OVA-V (10 μ g / 2.0mg aluminum hydroxide) and OVA-V challenge (5mg / mL) by nasal instillation for three consecutive days in three consecutive weeks. From day 38, the animals were challenged with aerosol of OVA-II (5% / 30 minutes) for five consecutive days. On the 43rd day, the outcome of the experimental protocol was obtained with the collection of biological material such as: nasal lavage (NALF), bronchoalveolar lavage (BALF), head, lung and blood for the appropriate analysis. The challenge with OVA in the sensitized animals promoted a significant increase ($p < 0.001$) in the clinical signs of rhinitis: nasal rubbing and sneezing in the weeks evaluated (1st, 2nd, 3rd and 4th) after OVA challenges when compared with the basal group. Similar results occurred in the nasal friction and sneezing after histamine-induced nasal reactivity (0.1, 1.0, 10, 100, 1000 nmol). The NALF and BALF analyzes demonstrated that the OVA challenges induced significant increases ($p < 0.001$) in the number of total inflammatory cells (10^5) when compared with the Basal group. In the NALF there was a percentage increase ($p < 0.001$) of eosinophils. However, in BALF there was an increase in the number of cells ($p < 0.001$) such as: eosinophils, macrophages and lymphocytes. In the analysis of the histological sections of the nasal cavity in the OVA group compared to the basal, there was an increase ($p < 0.001$) in the cellular migration, and in the lung tissue there was an increase ($p < 0.001$) in cell migration, mucus hyper production and tissue remodeling demonstrating tissue inflammation. The OVA group presented a significant increase ($p < 0.001$) in total IgE and OVA-specific IgE; in cytokines (IL4 and IL-13) and decreased in IFN γ / IL-4 ratio when compared to the Basal group. However, IFN γ concentrations were significantly decreased ($p < 0.01$) in the OVA group it was observed no changes in IL-10 concentration. Activation of p65 NF- κ B was evidenced in the OVA group in detriment to the Basal group. In view of the above, we concluded the effective implantation of the experimental protocol of CARAS induced by OVA in the Laboratory of Immunopharmacology / UFPB, and thus can be used to test new molecules in the treatment of this syndrome.

Key words: CARAS; Laboratory of Immunopharmacology; implantation; allergy; ovalbumin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenótipos, endotipos e biomarcadores da Rinite e Asma	24
Figura 2. Patofisiologia da CARAS	29
Figura 3. Esquema representativo do modelo experimental da CARAS	39
Figura 4. Esquema representativo do protocolo de dosagem de IgE e Citocinas utilizando o método de ELISA sanduiche	44
Figura 5. População de Linfócitos demarcada para análise da ativação do Fator de Transcrição NF-κB	45
Figura 6. Avaliação dos parâmetros histopatológicos no tecido da cavidade nasal dos animais com CARAS	57
Figura 7. Avaliação dos parâmetros patológicos no tecido da cavidade pulmonar, característicos da CARAS induzida por Ovalbumina, evidenciado no processo inflamatório da asma alérgica crônica	60
Figura 8. Avaliação da ativação do Fator de Transcrição NF-κB no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais no modelo da CARAS	40
Tabela 2. Score Histopatológico HE – Cavidade nasal	42
Tabela 3. Score Histopatológico HE – Cavidade pulmonar	43
Tabela 4. Score Histopatológico PAS – Cavidade pulmonar.....	43
Tabela 5. Score Histopatológico Tricrômio de Gomori – Cavidade pulmonar...	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio intranasal com Ovalbumina	49
Gráfico 2. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio aerossol com Ovalbumina, na fase crônica da inflamação alérgica	50
Gráfico 3. Avaliação da reatividade nasal a Histamina no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	52
Gráfico 4. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Nasal (NALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	54
Gráfico 5. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina	56
Gráfico 6. Score Inflamatório HE (Cavidade nasal)	58
Gráfico 7. Score inflamatório PAS (Cavidade pulmonar).....	61
Gráfico 8. Avaliação da produção de IgE, característica do modelo experimental da CARAS induzida por Ovalbumina.....	62
Gráfico 9. Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-13, IFNγ e IL-10 no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina	64
Gráfico 10. Avaliação da ativação do Fator de Transcrição NF-κB no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Micro litro
µg	Micro grama
µm	Micrômetro
Al(OH)₃	Hidróxido de Alumínio
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (<i>Antigen-Presenting Cell</i>)
BALF	Fluido do Lavado Broncoalveolar
CARAS	Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (<i>Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DC	Célula dendrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
ECP	Proteína Catiônica de Eosinófilos
EDN	Neurotoxina Derivada de Eosinófilos
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
e.p.m	Erro Padrão da Média
EPO	Peroxidase Eosinofílica
GATA-3	Fator de Transcrição de Ação Trans Específicos de Células T do Tipo 3
H1	Receptor de Histamina 1
H2	Receptor de Histamina 2
H3	Receptor de Histamina 3
H4	Receptor de Histamina 4
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
IFNγ	Interferon gama
IL	Interleucina
IgE	Imunoglobulina E
ILC-2	Célula Linfoide Inata do grupo 2 (<i>Innate Lymphoid Cells</i>)
IM	Intramuscular
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IpeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
i.t.	Intratraqueal

LIMFA	Laboratório de Imunofarmacologia
M2	Macrófagos do Tipo 2
MBP	Proteína Básica Principal
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe II
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NALF	Fluido do Lavado Nasal
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NIH	Institutos Nacionais de Saúde
nmol	Nanomol
OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
PLC	Fosfolipase C
R.A	Rinite Alérgica
RAN	Rinite Não Infecciosa e Não Alérgica
sc.	Subcutâneo
STAT-6	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 6
TCR	Receptor de Célula T
T CD4⁺	Linfócito T CD4 positivo
T CD8⁺	Linfócito T CD8 positivo
TG	Tricrômico de Gomori
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento beta
T_H	Perfil T <i>helper</i>
T_H2^{lo}	Perfil T <i>helper 2 lower</i>
T_H2^{hi}	Perfil T <i>helper 2 high</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNF-β	Fator de Necrose Tumoral Beta
Treg	Linfócito T regulatório
TSLP	Linfopoetina do estroma tímico (<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>)
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
vs	<i>versus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas)	21
2.2. Definição e Caracterização da Rinite e Asma	21
2.3. Epidemiologia da Rinite e Asma	22
2.4. Fenótipos, Endotipos e Biomarcadores de Rinite e Asma	23
2.5. Fisiopatologia da CARAS	24
2.5.1. Fase de sensibilização – 1º contato.....	25
2.5.2. Fase de reação imediata – 2º contato.....	26
2.5.3. Fase de reação tardia – manutenção do processo inflamatório ...	26
2.5.4. Imunorregulação da CARAS	30
2.6. Importância dos modelos experimentais.....	30
2.7. Protocolos experimentais de Rinite e Asma Alérgicas.....	31
3. OBJETIVOS	36
3.1. Geral	36
3.2. Específicos	36
4. METODOLOGIA	38
4.1. Animais	38
4.2. Protocolo Experimental da CARAS	38
4.3. Grupos experimentais	39
4.4. Sintomas Clínicos	40
4.5. Reatividade nasal induzida pela histamina.....	40
4.6. Quantificação celular	40
4.7. Análises histológicas das cavidades nasal e pulmonar	41
4.8. Quantificação de IgE e Citocinas.....	44
4.9. Marcação Celular (ativação do fator de transcrição NF-κB).....	45
4.10. Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS	48
5.1. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio intranasal com Ovalbumina	48
5.2. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio aerossol com Ovalbumina, na fase crônica da inflamação alérgica	50
5.3. Avaliação da reatividade nasal a Histamina no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina	51

5.4. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Nasal (NALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	53
5.5. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	55
5.6. Avaliação dos parâmetros histopatológicos observados no tecido da cavidade nasal dos animais com CARAS	57
5.7. Avaliação dos parâmetros histopatológicos no tecido da cavidade pulmonar dos animais com CARAS	58
5.8. Avaliação da produção de IgE, característica do modelo experimental da CARAS induzida por Ovalbumina	62
5.9. Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-13, IFN γ e IL-10 no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	63
5.10. Avaliação da expressão do Fator de Transcrição NF- κ B no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina.....	65
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA.....	88

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray shadow. The scroll is unrolled in the center, and the word "INTRODUÇÃO" is written across it in a black, elegant serif font.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A rinite e a asma alérgicas são distúrbios atópicos crônicos das vias aéreas caracterizadas por compartilharem mecanismos patológicos comuns, apresentando resposta T_H2 (resposta imune tipo 2) com infiltração eosinofílica, metaplasia das células caliciformes na mucosa subepitelial, bem como aumento nos níveis séricos de imunoglobulinas específicas (IgE), sendo classificadas como uma doença única das vias aéreas, conhecida por Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas - CARAS (*Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) (BROŽEK et al., 2017). A incidência dessas doenças vem aumentando em todo mundo, demonstrando o impacto na qualidade de vida dos indivíduos e gerando um custo financeiro e médico substancial (ASBAI, 2018; OMS, 2017; WHO, 2018).

Os modelos experimentais que mimetizam essas doenças são importantes para elucidar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento dos sintomas. Na literatura, são escassos os trabalhos que utilizam protocolos experimentais que mimetizam essas doenças, tornando-se fundamental a implantação e conhecimento dos parâmetros inflamatórios, imunológicos e mecanísticos no desenvolvimento desta síndrome, para que assim, possam ser estudados novos alvos moleculares, bem como novas moléculas, com o objetivo de melhorar a farmacoterapia destas doenças (LI et al., 2015, 2016; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Os sinais clínicos como espirros e fricções nasais, bem como os parâmetros de migração celular e consequente avaliação do tecido da cavidade nasal e pulmonar, evidenciando a produção de muco e remodelamento das vias aéreas, além da produção de IgE alérgeno-específica, quantificação das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e $INF\gamma$ e, em uma análise mais intracelular, observar a ativação do Fator Nuclear κB (NF- κB) são fundamentais para confirmação da instalação do processo inflamatório crônico alérgico nas vias aéreas dos animais, sendo característicos da CARAS (EIFAN; DURHAM, 2016; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

Com a implantação de modelos experimentais em laboratórios de pesquisa, torna-se mais acessível a busca por novos tratamentos que venham a melhorar a saúde do paciente e contribuir na disposição de um arsenal farmacológico mais eficaz.

Portanto, o presente trabalho objetivou a implantação do modelo experimental da CARAS, no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) da Universidade Federal

da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, utilizando como alérgeno a ovalbumina (OVA) em uma sequência de sensibilizações seguidas de desafios intranasal (i.n.) e aerossóis em camundongos BALB/c, analisando os mecanismos imunológicos característicos dessa síndrome alérgica, o que mimetiza a doença em humanos.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and a light gray shadow. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curving upwards. The text is centered within the scroll.

*FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA*

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas)

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS – *Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) se caracteriza por ser uma única doença das vias aéreas. Estudos sobre a fisiopatologia da rinite e asma alérgicas vêm comprovando uma íntima ligação na gênese de ambas as doenças. Estas são desencadeadas pelos mesmos agentes etiológicos, apresentam o mesmo perfil de células mediando os processos inflamatórios, são do sistema respiratório e compartilham o mesmo princípio terapêutico. Sendo de extrema importância pesquisas experimentais que, ao mimetizar em animais a CARAS, colaborem no entendimento da patogênese e tragam ao mercado farmacêutico novas moléculas, prováveis candidatas a serem utilizados como fármacos para as duas doenças e contribuam para o arsenal terapêutico no tratamento desta síndrome alérgica (BOUSQUET et al., 2008; IBIAPINA et al., 2006; LI et al., 2015, 2016).

2.2. Definição e Caracterização da Rinite e Asma

A rinite é um termo geral que descreve o aparecimento dos sintomas nasais: congestão nasal, rinorreia, espirros e prurido (coceira/fricção nasal), resultantes de um processo inflamatório e/ou disfunção da mucosa nasal. Em adição, provoca deficiência no sono, desvio comportamental e psicológico, chegando a ocasionar comprometimento da qualidade de vida dos pacientes, sendo considerada um fator de risco para segurança do trânsito (LEDFORD, 2003; MELTZER et al., 2012; VUURMAN et al., 2014).

A rinite é uma das doenças mais comum em todo o mundo e apresenta significativa morbidade, elevados custos financeiros (ZUBERBIER et al., 2014), é considerada um fator de risco para o desencadeamento da asma e também está associada a outras doenças crônicas respiratórias, como a rinosinusite (HENS et al., 2007).

A asma é definida como uma doença heterogênea, tendo como principal característica um processo inflamatório crônico pulmonar associado a uma hiperreatividade das vias aéreas a estímulos diretos e indiretos (GINA, 2017; HOLGATE et al., 2015). Apresenta os sintomas respiratórios: sibilância, falta de ar, tosse e

sensação de aperto no peito com limitação variável do fluxo de ar expiratório. Esses sintomas podem variar ao longo do tempo e de intensidade. Os sintomas asmáticos são desencadeados por diversos fatores, tais como, exercício, exposição a alérgeno ou a substâncias irritantes, mudança de clima e infecções respiratórias virais (FAHY, 2015b; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

2.3. Epidemiologia da Rinite e Asma

Atualmente, cerca de 25 % da população mundial apresenta um quadro de rinite alérgica (RA) (GÓMEZ et al., 2015; HANKIN; COX, 2014). No Brasil, atinge cerca de 29,6% entre adolescentes e 25,7% entre crianças na fase escolar. (ASBAI, 2018; SAKANO et al., 2017). Afeta a qualidade de vida dos indivíduos de forma negativa, interferindo na vida social, no desempenho escolar e intelectual, como também na produtividade no trabalho (GÓMEZ et al., 2015).

A asma acomete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em todos os países, independente do seu grau de desenvolvimento, é considerada uma das principais enfermidades não transmissíveis e está entre as mais prevalentes do mundo. A asma é a doença crônica mais frequente em crianças (OMS, 2017) e apresenta uma mortalidade preocupante, sendo esta doença responsável por 1 em cada 250 mortes no mundo. Em termos mundiais, os custos com a asma superam aos da tuberculose e HIV/AIDS somados (WHO, 2018). O Brasil é o 8º país em prevalência desta doença. Em 2015, foram notificadas 383.000 mortes por asma. No Brasil, é a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde e três pessoas morrem por dia no país em decorrência de crises asmáticas (WHO, 2018). No Brasil, 19% dos adolescentes e 24% das crianças são asmáticos (ASBAI, 2018).

A comorbidade entre essas duas doenças é íntima (BROŽEK et al., 2017), conferindo o padrão de uma única doença das vias aéreas (BOUSQUET et al., 2008; HENS et al., 2007). A rinite não tratada ou incorretamente manejada, eleva em até três vezes o risco de exacerbação asmática (BROŽEK et al., 2017). Além da hiperreatividade brônquica ser frequente em pacientes com rinite (BROŽEK et al., 2017). Ainda, é comum observar um quadro inflamatório nasal em asmáticos sem sintomas de rinite e inflamação brônquica em indivíduos com rinite sem sintomas de asma. Como também, a inflamação brônquica por provocação nasal com alérgenos e

inflamação nasal por provocação brônquica (BOUSQUET et al., 2008; BROŽEK et al., 2017; IBIAPINA et al., 2006).

2.4. Fenótipos, Endotipos e Biomarcadores de Rinite e Asma

A rinite e a asma são classificadas como doenças heterogêneas, resultantes de diversas etiologias. Neste contexto, a classificação mais aceita é a fenotípica, onde se padroniza um conjunto de resposta clínica, padrão temporal, gravidade, duração, controle, resposta ao tratamento e presença de comorbidades (MURARO et al., 2016).

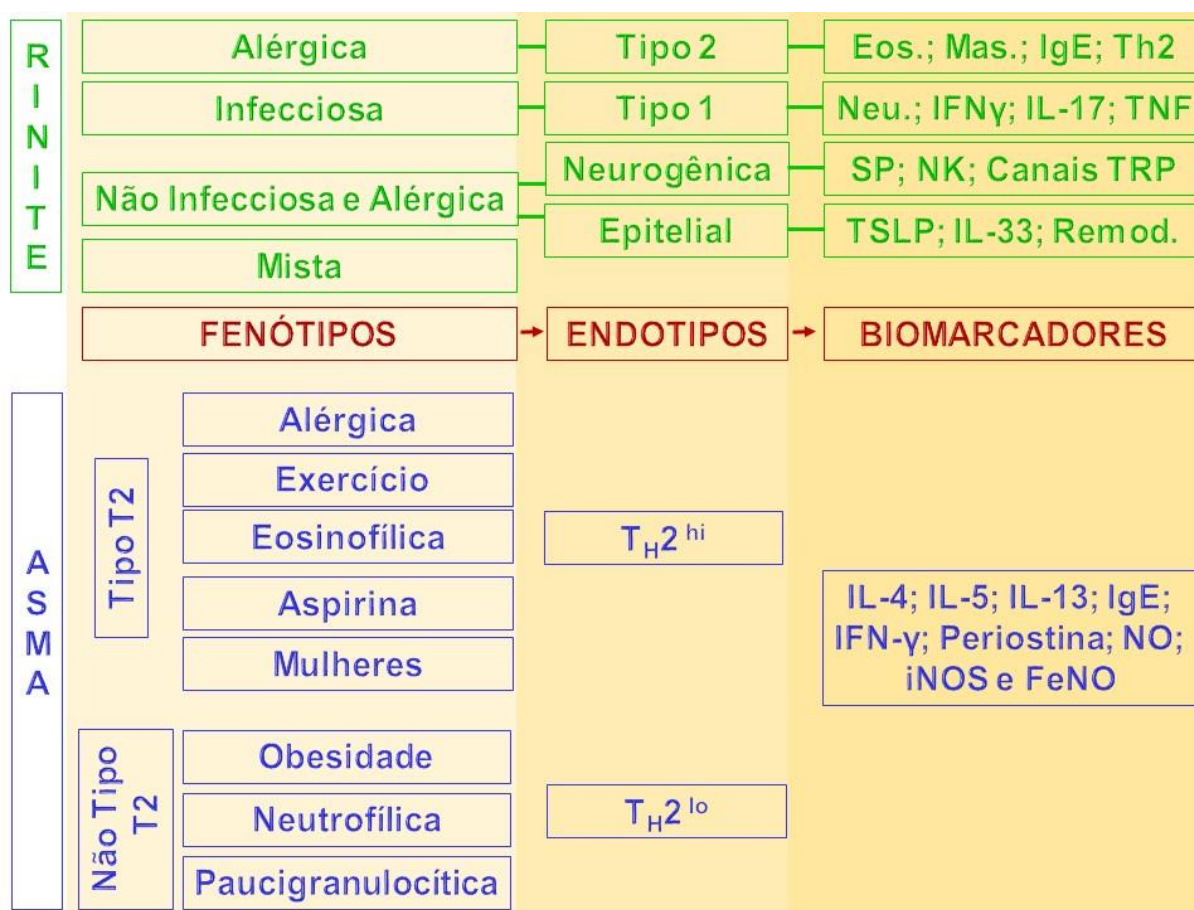
Atualmente, a rinite é dividida em quatro grandes fenótipos: rinite alérgica (RA), em resposta a aeroalérgenos em indivíduos sensibilizados; rinite infecciosa, em resposta a microrganismos, presentes na cavidade nasal; rinite não infecciosa e não alérgica (RAN), em resposta a irritantes, medicamentos, desequilíbrio hormonal e disfunção neuronal; e rinite mista, apresentando mais de dois fenótipos concomitante (HELLINGS et al., 2017; KALINER, 2009; ROBERTS et al., 2013; TRAN; VICKERY; BLAISS, 2011).

Ainda não se tem um consenso comum sobre a classificação fenotípica da asma, no entanto, a mais aceita, atualmente, baseia-se na fase da vida (infância ou fase adulta) em que os sintomas são apresentados. Dois grandes fenótipos são observados: asma tipo T₂, sendo prevalente a resposta T_H2 e de início precoce, na infância, e asma não tipo T₂, com mínima participação T_H2 e de início tardio, na fase adulta. Dentro desses dois grandes fenótipos, são distinguidos subfenótipos. Na asma tipo T₂, os subfenótipos de início precoce são asma alérgica e asma induzida por exercício; e de início tardio são a asma eosinofílica, asma induzida por aspirina e a asma com início mais tardio em mulheres. Na asma não tipo T₂ destaca-se os subfenótipos: asma associada a obesidade, asma neutrofílica associada ao tabagismo e asma paucigranulocítica mediada pelo músculo liso (FAHY, 2015b; GINA, 2017; HOLGATE et al., 2015)

Os endotipos e biomarcadores estão associados a classificação fenotípica, visando identificar alvos moleculares (fisiopatologia) na gênese da doença, possibilitando um tratamento direcionado e mais preciso para o paciente (HELLINGS et al., 2017; MURARO et al., 2016). Assim, a rinite é dividida em 4 endotipos: resposta imune Tipo 2; resposta imune Tipo 1; rinite neurogênica e disfunção

epitelial (MURARO et al., 2016). Na asma, o único endotipo estabelecido é o T_{H2} . Este é presente de forma exacerbada (T_{H2}^{hi}) nos fenótipos tipo T2 e ausente ou pouco observado (T_{H2}^{lo}) nos fenótipos não tipo T2 (BOULET, 2018; FAHY, 2015b; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; WYNN, 2015). Na figura 1 está representado esquematicamente os fenótipos, endotipos e biomarcadores da rinite e asma.

Figura 1. Fenótipos, endotipos e biomarcadores da Rinite e Asma



Eos (Eosinófilos); Mas (Mastócitos); IgE (Imunoglobulina E); T_{H2} (Linfócito T helper 2); Neu (Neutrófilos); IFN- γ (Interferon-gama); IL (Interleucina); TNF (Fator de necrose tumoral); SP (Substância P); NK (Neurocinina); Canais TRP (Receptor de potencial transitório); TSLP (Linfopoetina do estroma tímico); Remod (Remodelamento tecidual); NO (Óxido nítrico); iNOS (Óxido nítrico sintetase induzível); FeNO (Concentração fracionada de óxido nítrico exalado). Fonte: Ferreira, 2018.

2.5. Fisiopatologia da CARAS

A CARAS é caracterizada por apresentar uma resposta predominante T_{H2} , onde sua fisiopatologia está diretamente relacionada a indivíduos atópicos, os quais são geneticamente predisponentes a desencadearem um processo de hipersensibilidade imediata (T_{H2}). O indivíduo alérgico ao entrar em contato com aeroalérgenos (elementos proteicos solúveis de baixo peso molecular) presentes em

ácaros da poeira; nas asas das baratas; em fungos; em pelos, saliva e urina de animais domésticos; restos de insetos e alimentos (RUBINI et al., 2017) e que são facilmente dispersos no ar e penetram no epitélio respiratório promovendo um desequilíbrio entre imunidade inata e adaptativa promovendo o surgimento da CARAS (EIFAN; DURHAM, 2016).

2.5.1. Fase de sensibilização – 1º contato

No primeiro contato do alérgeno com o indivíduo atópico, este irá penetrar no epitélio respiratório e assim ativar células epiteliais, promovendo a secreção de citocinas, alarminas, Linfopoetina do Estroma Tímico (TSLP), IL-33 e IL-25, importantes no desenvolvimento e progressão do processo inflamatório da CARAS (EIFAN et al., 2012). As alarminas atuam em células situadas intra-epitélio ou abaixo do epitélio respiratório, dentre elas, as células linfóides inatas do grupo 2 (ILC-2), ativando a produção de citocinas clássicas da resposta tipo 2 (IL-13 e IL-5). As alarminas também atuam nas células apresentadoras de antígenos (APCs), em especial nas células dendríticas (DCs) (EIFAN; DURHAM, 2016; HAENUKI et al., 2012; LICONA-LIMÓN et al., 2013; MELUM et al., 2014; NASR et al., 2017).

As DCs, após ativadas pelas alarminas e em contato com o alérgeno, se dirigem aos linfonodos de drenagem e apresentam peptídeos alergênicos, via molécula do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC-II) classe 2, ao receptor de células T (TCR) dos linfócitos T CD4⁺ virgem, na presença de IL-4, ocorre a polarização para o perfil T_H2, com ativação dos fatores de transcrição GATA-3 (fator de transcrição de ação trans específicos de células T do tipo 3) e STAT-6. Os linfócitos T_H2 produzem as citocinas clássicas do perfil de resposta tipo 2 (IL-4, IL-13 e IL-5), a partir da ativação de fatores transcripcionais como o NF-κB (HOLGATE et al., 2015).

A IL-4 e IL-13, por compartilharem receptores celulares, ativam os linfócitos B, esses se diferenciam em plasmócitos (célula B ativada e produtora de anticorpos), e estes passam a produzir anticorpos específicos (IgE) para o determinado alérgeno. A IgE– alérgeno específica se ligará aos seus receptores de alta afinidade I (FcεRI) presentes na membrana citoplasmática de mastócitos teciduais e basófilos e eosinófilos circulantes. Esse processo é denominado de sensibilização alérgica,

após o 1º contato com o alérgeno (GOULD; SUTTON, 2008; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; WYNN, 2015).

2.5.2. Fase de reação imediata – 2º contato

Em um contato posterior do indivíduo sensibilizado com o alérgeno, este se ligará diretamente ao complexo IgE–FcεRI acoplados a membrana de mastócitos teciduais e basófilos/eosinófilos circulantes. A ligação cruzada ocasionará ativação celular com liberação dos grânulos contendo mediadores pré-estocados, como a histamina, no processo denominado degranulação celular, e, formação de outros mediadores como prostaglandinas e leucotrienos (BOULET, 2018; EIFAN; DURHAM, 2016). Os mastócitos residem próximo a superfície da mucosa e de vasos sanguíneos, se maturam pela ação do fator de células tronco (SCF) e da IL-3 (GURISH; AUSTEN, 2012). Os basófilos circulantes amplificam a resposta alérgica por liberar na corrente sanguínea, principalmente histamina, além de produzirem grandes quantidades de IL-4 (YOSHIMOTO et al., 2009).

A histamina, por ser um dos primeiros mediadores liberados no processo de ligação cruzada entre o alérgeno e seu receptor na célula, ela desempenha um papel central na CARAS promovendo vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular, proporcionando a formação do edema, e a migração de células inflamatórias para as vias aéreas e broncoconstrição. Nas vias aéreas superiores, a histamina tem um papel fundamental na atuação sobre as terminações nervosas sensoriais, na estimulação reflexa parassimpática das secreções glandulares e na vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, promovendo os sintomas da reação imediata da fisiopatologia da RA (prurido nasal, espirros, rinorreia) (SIMONS; SIMONS, 2011; XU; ZHANG; WANG, 2014).

2.5.3. Fase de reação tardia – manutenção do processo inflamatório

A manutenção do processo inflamatório T_H2 e cronicidade da CARAS é mediada por uma rede intensa de células e mediadores, onde cada vez mais a interação entre eles é estudada. A IL-4 tem um papel essencial na polarização do

perfil T_H2, funcionando como um *feedback* positivo na manutenção da resposta tipo 2 (BOULET, 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015; WYNN, 2015).

O compartilhamento de receptores celular indica que a IL-4 e IL-13 possuem um papel fundamental na amplificação do processo inflamatório tecidual na CARAS, ativando os macrófagos tipo 2 (M2) a produzirem a citocina TGF- β , esta, por sua vez, ativa os fibroblastos a produzirem fibras colágenas, as quais se depositam nas vias áreas, levando um quadro de fibrose tecidual e remodelamento (BAGNASCO et al., 2016; GOUR; WILLS-KARP, 2015; HOLGATE et al., 2015). A IL-4 e IL-13 também ativam diretamente os fibroblastos promovendo uma hiperprodução de colágeno nas vias áreas. Nas células musculares lisas, essas duas citocinas participam ativamente do processo de hipertrofia e hiperplasia muscular, levando a um quadro de hiper-reatividade das vias áreas (BOULET, 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015). A IL-13 promove ainda a hipersecreção de mucinas, e, conseqüentemente, muco pelas células caliciformes das vias áreas. Também está envolvida no processo de hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes e na metaplasia de células ciliadas epiteliais (Clara), se diferenciando em células produtoras de muco (BARLOW et al., 2012; GOUR; WILLS-KARP, 2015).

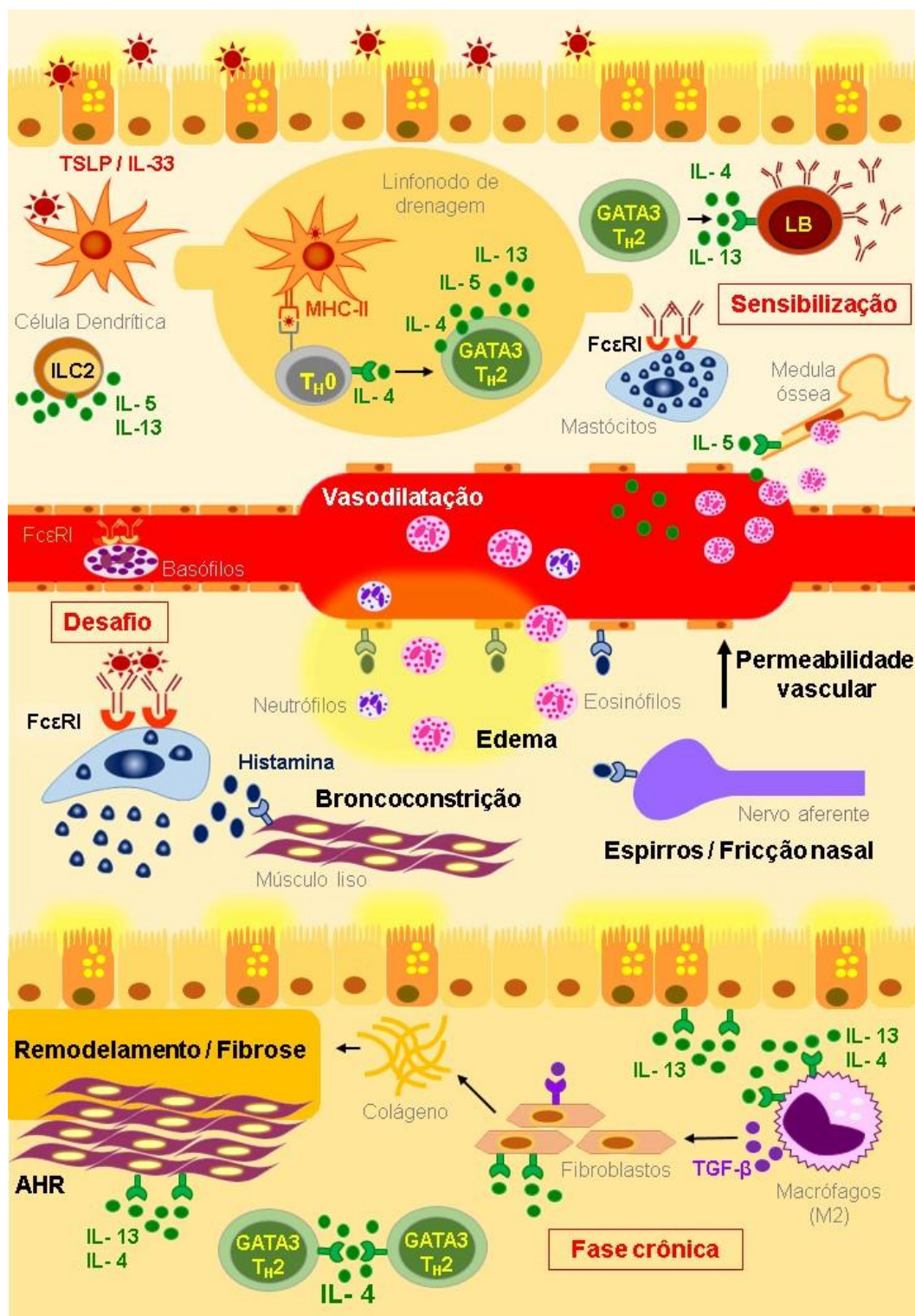
A IL-5 é uma citocina clássica do perfil T_H2 que está diretamente relacionada ao processo de produção na medula óssea, maturação e migração eosinófila para as vias aéreas (HOLGATE et al., 2015; POSSA et al., 2013). O recrutamento de eosinófilos decorre da atuação de quimiocinas, como eotaxina 1, 2 e 3 (CCL11, CCL24 e CCL26, respectivamente). O acúmulo de eosinófilos ativados nas vias aéreas gera quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a proteína catiônica eosinófila (ECP) e proteína básica principal (MBP), que provocam ruptura da integridade do epitélio causando diretamente a hiper-reatividade das vias aéreas (BARNES, 2017; GEORGE; BRIGHTLING, 2016b; YOUSEFI; SIMON; SIMON, 2012).

Os eosinófilos possuem a capacidade de apresentar os antígenos aos linfócitos T (BARNES, 2008; VAN RIJT et al., 2003) e ainda, os eosinófilos que infiltram nas mucosas das vias aéreas têm a capacidade de fixar IgEs nas suas membranas e respondem ao contato com o alérgeno liberando mediadores (SHAKOORY et al., 2004).

As proteínas derivadas de eosinófilos participam da inflamação persistente das vias aéreas, e têm sido associadas a exacerbações e declínio da função pulmonar (GEORGE; BRIGHTLING, 2016a; GREEN et al., 2002; JATAKANON A,

LIM S, 2000; SIVA et al., 2007). Os eosinófilos também contribuem para o remodelamento das vias aéreas (FLOOD-PAGE et al., 2003; KAY, 2015; KAY; PHIPPS; ROBINSON, 2004). Este remodelamento é consequência do aumento da deposição da matriz extracelular, do aumento das células mesenquimais subepiteliais e, principalmente, do aumento da massa muscular lisa da via aérea, que é o principal determinante da obstrução do fluxo aéreo. O TGF- β derivado de eosinófilos ativa a liberação de fibroblasto e proteínas da matriz, provocando o espessamento da membrana basal reticular e associando à inflamação eosinofílica na CARAS (BRIGHTLING et al., 2003; ELTBOLI et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2008). Na figura 2 está representado esquematicamente a fisiopatologia da CARAS.

Figura 2. Fisiopatologia da CARAS



A patofisiologia da CARAS, em decorrência da ativação do sistema imune, quando exposto ao alérgeno, pode ser dividida em três etapas: A sensibilização do organismo com produção de IgE-alérgeno específica; A fase de reação imediata ou desafio, devido ao segundo contato com o alérgeno e promoção dos sintomas clínicos, edema, vasodilatação, permeabilidade vascular, broncoconstrição e a fase crônica com manutenção do processo inflamatório T_{H2}, com hipersecreção de muco, remodelamento e hiper-reatividade das vias aéreas. TSLP (Linfopoetina do Estroma Tímico); IL (Interleucina); ILC-2 (Célula Linfóide Inata do Grupo 2); MHC-II (Molécula do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe 2); GATA-3 (Fator de Transcrição de Ação Trans Específicos de Células T do tipo 3); LB (Linfócitos B); AHR (Hiper-reatividade das vias aéreas). Fonte: Ferreira, 2018.

2.5.4. Imunorregulação da CARAS

Os mecanismos responsáveis por regular as respostas imunológicas no contexto da patogênese da CARAS envolvem o papel das células T regulatórias - Treg (produtoras de IL-10) com efeito supressor sobre outras células T CD4⁺. Essas células têm importante papel na regulação da função das células T_{H2} na asma e rinite alérgicas (BARNES, 2008; FAHY, 2015b; UMETSU; DEKRUYFF, 2006).

As células T CD8⁺ também desempenham um papel imunorregulador no processo inflamatório das vias aéreas na CARAS devido a inibição do processo de sensibilização do organismo para alérgenos, atenuando a resposta T_{H2} via inibição da produção de IgE, produzindo a citocina IFN- γ , a qual está envolvida na alteração da capacidade das células dendríticas (DCs), durante a apresentação antigênica, polarizar os linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo T_{H1} (EIFAN et al., 2012; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; TANG et al., 2012). A depleção dos linfócitos T CD8⁺ está envolvida com o aumento dos níveis séricos de IgE alérgeno-específica, remodelamento e hiper-reatividade das vias aéreas (BOULET, 2018; STOCK et al., 2004).

Outra população de célula T capaz de imunomodular a resposta imune tipo 2 (T_{H2}) na CARAS é o perfil de resposta imune T_{H1} com a produção principalmente de IFN- γ , IL-2 e TNF- β . O IFN- γ antagoniza a formação do fator de transcrição GATA-3 responsável pela geração das células T_{H2}. Estudos têm mostrado que o processo inflamatório da asma pode ser suprimido pela transferência de células T_{H1} ou mesmo pela administração de IL-12, citocina responsável pela ativação do fator de transcrição T bet que induz a produção das citocinas (IFN- γ , IL-2 e TNF- β) detectadas no perfil de resposta T_{H1} (FAHY, 2015b; GAVETT et al., 1995; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

2.6. Importância dos modelos experimentais

Os modelos experimentais de doenças são necessários para um melhor entendimento e elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das doenças e, conseqüente, avaliação da segurança e eficácia de novas terapias, antes destas serem introduzidas nos ensaios clínicos em humanos (KUMAR et al., 2002). Porém, requisitos para o uso de animais em experimentação foram publicados pelos

Institutos Nacionais de Saúde (NIH) – (Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório – NIH, publicação 85-23, que já está na sua 8ª edição, lançada em 2011), ressaltando o cumprimento de preceitos éticos para a aceitação da utilização de animais experimentais.

Uma limitação dos modelos animais é não mimetizar a soma das características fenotípicas e endotípicas da asma e da rinite. Porém, os modelos animais têm sido fundamentais para ampliação e melhor elucidação do conhecimento dos parâmetros inflamatórios, estruturais e fisiológicos presentes nos quadros das doenças do trato respiratório, observados em modelos experimentais separados (CHAPMAN et al., 2014; CHEN et al., 2017; KIM; HONG; LEE, 2015; KUYAMA et al., 2010a; REN et al., 2017; SAGAR; AKBARSHAH; ULLER, 2015; SUN et al., 2016). Já foi descrito distintos fenótipos destas doenças (AGACHE; AKDIS, 2016; CASALE, 2017), mas para a identificação é necessária a elucidação de biomarcadores, que as diferenciam (GUIBAS et al., 2017).

Os modelos de animais utilizados para investigação das doenças respiratórias alérgicas induzidas por Ovalbumina (OVA) e aeroalérgenos têm sido amplamente utilizados para elucidar mecanismos imunológicos e não imunológicos envolvidos na patogênese da asma e da rinite. Além disso, eles são úteis para identificar e investigar novos alvos moleculares para controlar a inflamação alérgica (NIALS; UDDIN, 2008; VAN DER WERP et al., 2010).

Na literatura, até 2017, apenas cinco trabalhos utilizaram o modelo experimental da CARAS (LI et al., 2015, 2016; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Porém, a utilização desse modelo experimental representa um cenário favorável para entender a fisiopatologia dessa síndrome, além de ser fundamental para os testes de potenciais terapias medicamentosas, uma vez tendo resultados positivos nos animais, abre caminho para sua transposição em estudos clínicos (SAGAR; AKBARSHAH; ULLER, 2015; SZELENYI, 2000).

2.7. Protocolos experimentais de Rinite e Asma Alérgicas

Os protocolos experimentais utilizando modelos animais de doenças respiratórias alérgicas têm sido amplamente utilizados com o objetivo de observar os quadros de asma e rinite humanas. Não obstante, os camundongos, de maneira

semelhante a maioria dos animais, não desenvolvem naturalmente uma doença inflamatória crônica alérgica, de forma que os modelos animais requerem protocolos que apresentem sensibilização a um alérgeno e posterior reexposição ao mesmo para induzir uma resposta inflamatória alérgica (CHAPMAN et al., 2014).

Na literatura, trabalhos experimentais demonstram que tanto a asma como a rinite são doenças crônicas resultantes da exposição intermitente ou contínua a aeroalérgenos responsáveis por desenvolver o quadro inflamatório e, conseqüente, resposta imune exacerbada nas vias aéreas. Essa exposição se dá, principalmente pela via aérea, por inalação desses alérgenos, no momento da respiração. Diante disso, a forma de instilação nasal nos animais, nos protocolos experimentais, é a mais análoga ao que acontece na asma e rinite humanas (JOHNSON et al., 2004; KRIEGER et al., 2013; PETERS et al., 2016).

Para mimetização da asma e da rinite humana, a fase de sensibilização e desafio devem ser contempladas nos modelos experimentais (AUN et al., 2017). O primeiro contato com o alérgeno, de forma sistêmica, caracteriza a sensibilização e repetidas reexposições constituem a fase de desafio (LAMBRECHT et al., 2009; NIALS; UDDIN, 2008). Nos humanos, a mucosa respiratória é a forma de exposição ao alérgeno e, conseqüente, ativação da resposta imunológica do tipo 2 (T_H2), caracterizando a sensibilização. Já nos modelos experimentais animais, o sistema imunológico é ativado mediante a apresentação alergênica pela injeção subcutânea (sc), injeção intraperitoneal (i.p), gotas intranasais (i.n) ou inalação (AUN et al., 2017). A via i.p é a forma mais tradicional de induzir o processo de sensibilização. Um dos protocolos experimentais que mimetizam a rinite e a asma humana e que é mais, frequentemente, utilizado e repetido por diversos grupos de pesquisa é a sensibilização de camundongos da linhagem isogênica BALB/c ao alérgeno (frequentemente a OVA), via i.p, com duas administrações espaçadas por 7 a 14 dias e o desafio (via aerossol) alergênico ocorre após uma semana da última injeção da sensibilização (FORNHEM et al., 1995; KIRSCHVINK et al., 2007; TAKAZONO; SHEPPARD, 2017).

O desafio antigênico é essencial para promover o processo inflamatório das vias aéreas, logo após a sensibilização sistêmica ter ocorrido. A maior parte dos artigos presentes na literatura, até o momento, utiliza, no protocolo, o desafio antigênico por meio das vias aéreas, durante vários dias. Este desafio pode ser de forma inalatória pela nebulização (aerossol), administrado por instilação intratraqueal (i.n) ou intranasal (i.n) em formulação aquosa (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008;

OHRUI et al., 1992; WAGERS et al., 2004). A via de escolha utilizada pela maioria dos autores nos protocolos experimentais é a via de ataque com aerossóis, porém esta utiliza maior quantidade de alérgeno, mas é menos invasiva e não requer sedação do animal. Já as vias i.n e i.t além de requerem sedação para serem administradas, tornam-se mais invasivas, apesar de terem como evidente vantagem o fato dos alérgenos serem instilados localmente e diretamente nas vias aéreas, o que leva a uma inflamação alérgica mais exacerbada e intensa (AUN et al., 2017).

A exposição crônica que ocorre em vários dias ao alérgeno mimetiza de forma mais significativa a asma e rinite humanas, o que torna possível o estudo de novos medicamentos e estratégias imunoterapêuticas. Os protocolos experimentais com modelos animais, de uma forma geral, foram imprescindíveis no entendimento atual da interação do sistema imune com o sistema respiratório, no tangente a sua fisiopatologia (AUN et al., 2017).

Os modelos experimentais crônicos de doenças respiratórias alérgicas compreendem exposição repetida das vias aéreas a baixas concentrações de alérgenos por períodos de até 12 semanas (NIALS; UDDIN, 2008). Esses alérgenos expostos a longo prazo, em particular, são antígenos proteicos, como a OVA (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008).

Vários são os alérgenos utilizados em modelos animais para o desenvolvimento das doenças do trato respiratório, como a asma e a rinite alérgicas. Na literatura, observa-se a utilização mais acentuada e mais contínua da OVA, porém encontram-se artigos que utilizam como alérgenos os ácaros domésticos (HDM), como *Dermatophagoides pteronvssinus* (Der p) ou *D. farinae* (Der f), e suas variações Der p 1, Der f 1, Der p 23; fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*); extratos de barata; antígenos de *Ascaris*; pó de algodão; ambrósia e látex (*Hevea brasiliensis*). A escolha do alérgeno depende da condição a ser replicada e pode ser usado isolado ou em associação (ZOSKY; SLY, 2007).

A OVA é o alérgeno mais utilizado. É a principal proteína encontrada na clara de ovo, constituindo aproximadamente 55% da proteína total desta (SANO et al., 1999) e pode ser sintetizada em grandes escalas, possibilitando sua aquisição em grandes quantidades, o que a torna de baixo custo financeiro. Já é bem descrito a utilização da OVA em modelos experimentais de asma e rinite, desencadeando processos inflamatórios alérgicos mais intensos tanto na cavidade nasal, como pulmonar (BARRETT et al., 2009; KIM et al., 2006).

No processo de sensibilização, costumam-se usar doses repetidas dos alérgenos juntamente com adjuvantes para aumentar a resposta imune (NIALS; UDDIN, 2008). Esses adjuvantes, como o hidróxido de alumínio, são utilizados para aumentar a imunogenicidade dos alérgenos, aumentando as respostas de anticorpos e ativação das células imunes inatas, que promovem, então, uma resposta do perfil T_H2 , permitindo uma melhor eficácia do processo de sensibilização (CHAPMAN et al., 2014; ISHIDA et al., 2011; LAMBRECHT et al., 2009).

Várias espécies de animais são utilizadas para compreender os mecanismos envolvidos na patogênese da asma e da rinite, como por exemplo, camundongos, cobaia, gato, cão, porco, gado, ovelha, cavalo e primatas, porém, o modelo mais comumente utilizado é a inflamação das vias aéreas alérgicas de camundongos (BLUME; DAVIES, 2013; CHAPMAN et al., 2014; CHEN et al., 2017; KIM; HONG; LEE, 2015; KIRSCHVINK; REINHOLD, 2008; KUYAMA et al., 2010a; REN et al., 2017; SAGAR; AKBARSHAH; ULLER, 2015; SUN et al., 2016; ZOSKY; SLY, 2007).

Os camundongos se destacam por vários motivos, um deles é o tempo de gestação ser bem menor que os demais, em torno de 20 dias, e terem um maior número de descendentes (AUN et al., 2017; CANNING; CHOU, 2008). Eles se tornaram a espécie mais utilizada porque são fáceis de criar, manter e manipular. Além de ter uma grande variedade de reagentes específicos disponíveis para análise das respostas celulares e humorais. Apresentam ainda uma maior facilidade de mutação genética, os chamados camundongos transgênicos ou camundongos nocaute (gene-knockout), estes são geneticamente modificados para modelagem das doenças de vias aéreas (BONAMICHI-SANTOS et al., 2015; SHAPIRO, 2008).

A linhagem isogênica de camundongo mais utilizada nos modelos experimentais de asma e rinite com sensibilizações e desafios com antígeno OVA é a BALB/c, esta é caracterizada por desenvolver uma boa resposta imunológica polarizada para o perfil T_H2 , o que torna seu uso um sucesso nos protocolos animais. Porém, as linhagens isogênicas C57BL/6 e A/J também são utilizadas em modelos experimentais de doenças respiratórias alérgicas e demonstraram uma resposta satisfatória (NIALS; UDDIN, 2008).

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray shadow. The scroll is unrolled in the middle, revealing the text. The left and right ends of the scroll are rolled up.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Implantar e padronizar o modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) induzida por Ovalbumina (OVA) no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA), do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

3.2. Específicos

- ✓ Quantificar os sintomas clínicos, característicos da rinite alérgica, tais como espirros e prurido nasal nos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Avaliar a reatividade nasal pelos desafios com histamina nos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Investigar o perfil da migração celular para as cavidades nasal e pulmonar nos sobrenadantes dos lavados nasais (NALF) e broncoalveolares (BALF) nos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Analisar os cortes histológicos dos tecidos nasal e pulmonar dos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Quantificar a produção de IgE nos soros dos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Quantificar a produção de citocinas do perfil T_H2 , T_H1 e Treg nos sobrenadantes dos BALF nos animais sensibilizados e desafiados com OVA;
- ✓ Verificar a ativação do fator de transcrição NF- κ B.



METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

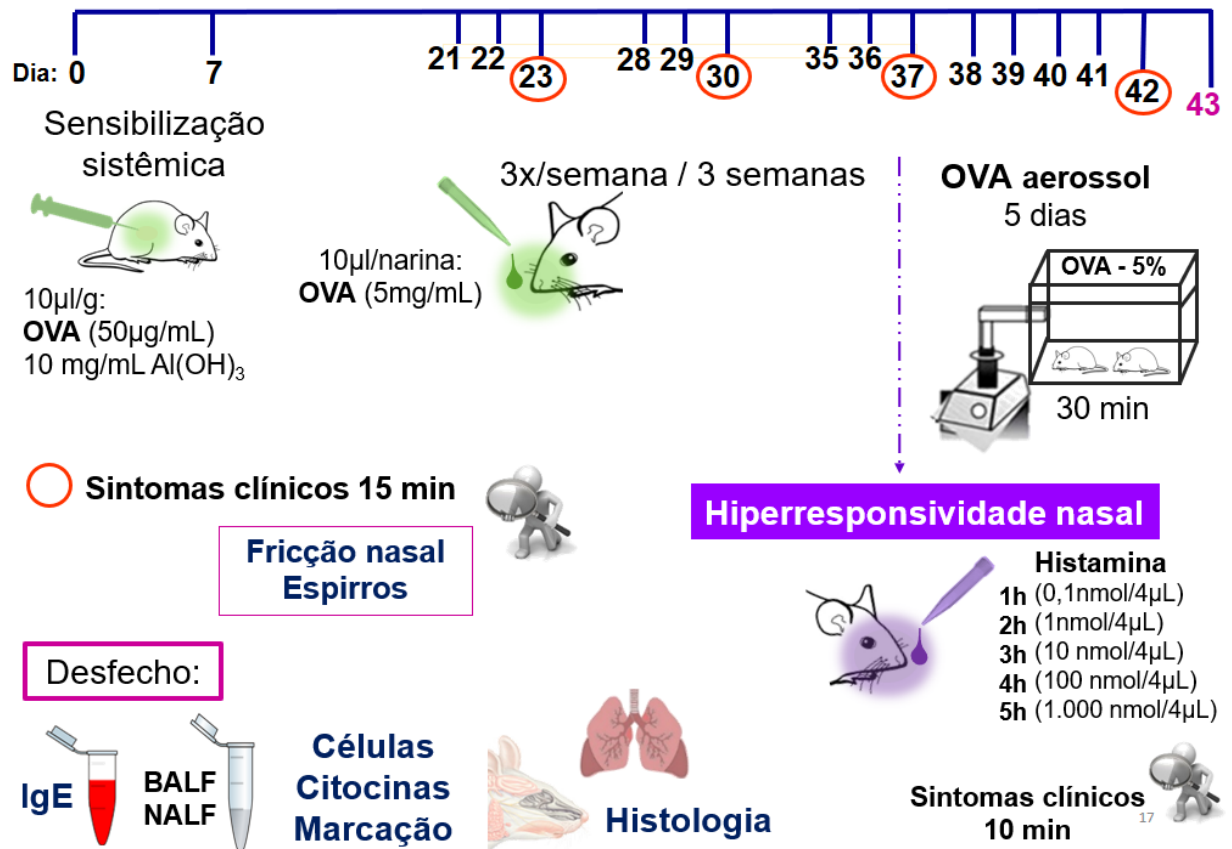
Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, pesando entre 20 a 25g, foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George, do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), UFPB, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental apresentou o número de 6 animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intra-muscular (IM) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de ketamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9%). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob o protocolo de número 165/2015 (Anexo 1).

4.2. Protocolo Experimental da CARAS

O modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) desenvolvido teve como base a metodologia descrita no trabalho de LI et al. (2015, 2016) com adaptações. Nos dias zero (0) e sete os camundongos foram sensibilizados com a injeção de 10 µL/g do animal, intraperitoneal (i.p.) de uma suspensão contendo 50 µg/mL de OVA grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de Al(OH)₃ (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina. Durante três dias consecutivos, em três semanas consecutivas, os animais foram desafiados por instilação nasal com uma solução de OVA-V (5mg/mL), foi administrado 20 µL/animal. A partir do 38º dia, por cinco dias consecutivos, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5% em solução salina. Os desafios foram realizados durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultra-

sônico. No 43° dia do protocolo, ocorreu o desfecho do protocolo e coleta do material biológico para análise dos parâmetros imunológicos. A **Figura 5** esquematiza os passos realizados durante a execução do protocolo experimental da CARAS.

Figura 3. Esquema representativo do modelo experimental da CARAS



4.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais (n=6), o grupo Basal representa animais saudáveis (não sensibilizado e não desafiado com OVA, apenas a solução salina foi administrada), que expressam os níveis imunológicos basais e o grupo OVA (sensibilizado e desafiado com OVA), representa animais doentes, com o quadro fisiopatológico da CARAS. A **Tabela 1** demonstra a sensibilização e desafio dos grupos experimentais para melhor compreensão.

Tabela 1. Grupos experimentais no modelo da CARAS

Grupo	Sensibilização	Desafio
Basal	Salina	Salina
OVA	OVA	OVA

4.4. Sintomas Clínicos

Os sintomas clínicos nasais, fricção nasal e espirro, foram quantificados por 15 minutos em cada camundongo de cada grupo nos dias 23^o, 30^o, 37^o e 42^o do protocolo, imediatamente após o desafio com OVA. Foi feita uma contagem duplo-cega (KUYAMA et al., 2010).

4.5. Reatividade nasal induzida pela histamina

A hiper-reatividade nasal a histamina foi determinada pela quantificação dos sinais clínicos: espirro e fricção nasal, durante 10 minutos, após a administração de doses crescentes de histamina diluída em solução salina, na cavidade nasal. No dia 37^o, uma hora após o desafio com o alérgeno, quatro microlitros de doses crescentes de histamina (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol/ camundongo) foram instilados na cavidade nasal de forma consecutiva em intervalos de 60 minutos (KUYAMA et al., 2010).

4.6. Quantificação celular

Para quantificar a migração de células inflamatórias foram coletados o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e o fluido do lavado nasal (NALF). Esses foram coletados no 43^o dia do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio. O BALF foi realizado com 1,5 mL de HBSS+/- gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia, já o NALF foi realizado com 1mL de HBSS+/- gelado, injetado na

nasofaringe do animal pela traqueia, sentido traqueia-nariz, os fluidos foram transferidos para tubos tipo eppendorf e armazenados em isopor refrigerado. A contagem do número total de células no BALF e NALF foi realizada em câmara hemocitométrica. O BALF foi diluído (1:4) e o NALF foi diluído (1:2) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), depois de coletados, armazenados e homogeneizados, foi coletado 10 µL do BALF e adicionado a 30 µL de Turk e 20 µL do NALF adicionado a 20 µL de Turk; a contagem das células totais foi realizada no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS).

Após a contagem das células totais ser realizada, os tubos foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 300 g, em uma temperatura de 4 °C, por 6 minutos. Os sobrenadantes foram separados das amostras e congelados no freezer a uma temperatura de -20 °C para posterior dosagem de citocinas. Para contagem diferencial, o *pellet* foi ressuspenso em 300 µL de HBSS+/- gelado, depois de homogeneizado foram retirados 200 µL de cada BALF e NALF e foram centrifugados em centrífuga tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram divididos em quatro classes: monócitos/macrófagos; linfócitos; neutrófilos e eosinófilos.

4.7. Análises histológicas das cavidades nasal e pulmonar

A cavidade nasal de cada animal foi coletada 24 horas após o último desafio, fixada em formalina tamponada por 24 h para interromper a degradação do tecido pela ação de enzimas celulares (autólise) ou de microrganismos após a morte do animal. Em seguida, as amostras foram colocadas em solução de ácido nítrico 1% para processo de descalcificação e, dois dias após, foram submetidas a lavagem em água corrente por 30 minutos para retirada do excesso do descalcificador. As amostras foram incubadas em álcool etílico 70% e desidratadas em diferentes concentrações de álcool etílico 80, 90, 95 e 100%, 30 minutos, em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à diafanização, banhos em xilol I e xilol II por 30 minutos para preparar as amostras para a inclusão em parafina. Em seguida, foram imersas em parafina líquida mantida a temperatura de 56°C, sendo

dois os banhos, cada um de 1 hora em parafina I e II para infiltração desta na amostra. Posteriormente, o tecido foi transferido para o molde (forma histológica) onde foi imerso em parafina (Parafina para análise histológica- QEEL, São Paulo, SP). Em seguida, foi realizada a microtomia, a espessura dos cortes foi de 4 µm. Com os cortes aderidos as lâminas, foi realizada a coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para análise de parâmetros inflamatórios. Após a análise morfológica, foi criado um *score* (pontuação), com a finalidade de gerar significância as avaliações visuais, correlacionando esses achados a clínica dos animais acometidos com rinite, onde os valores atribuídos finais são uma somatória das lesões avaliadas. Os parâmetros pontuados estão expressos na tabela abaixo:

Tabela 2. Score Inflamatório HE – Cavidade nasal

Lesões avaliadas	Valor atribuído
Infiltrado Inflamatório	00 - 03
Destruição do epitélio nasal	00 - 03
Edema de mucosa	00 - 02
Vasodilatação	00 - 02

Adaptado de Galvão et.al., 2017

Para avaliar as características histológicas pulmonares dos camundongos, o pulmão foi coletado 24 horas após o último desafio do protocolo de CARAS e fixado em formalina tamponada, em sequência, foi hidratado em água corrente durante 24 horas; desidratado por 30 minutos em cada diferente concentração de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%); xilol por 30 minutos; parafina líquida (parafina histológica- ERVIEGAS, São Paulo, SP), após solidificação, obteve-se o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior. O corte histológico teve espessura de 5µm, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Com os cortes aderidos nas lâminas, estes foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE), para avaliação de parâmetros teciduais gerais; Ácido Periódico de Schiff (PAS), para avaliação da hipersecreção de muco e Tricrômico de Gomori (TG), para observação da expansão da matriz extracelular. Depois, foi realizado a montagem das lâminas. Após a análise morfológica, foi criado um *score* (pontuação), com a finalidade de gerar significância as avaliações visuais, correlacionando esses achados a clínica dos animais acometidos com asma (GALVÃO et al., 2017), onde os valores atribuídos finais são

uma somatória das lesões avaliadas, para cada corante utilizado, o qual está expresso nas tabelas abaixo:

1. Para a análise em HE:

Tabela 3. Score Inflamatório HE – Cavidade pulmonar

Lesões avaliadas	Valor atribuído
Infiltrado Peribroquiolo vascular	00 – 03
Hipertrofia e Hiperplasia de Células Caliciformes	00 – 02
Tampão Mucoso	00 – 02
Infiltrado Perivascular	00 – 01
Infiltrado Peribronquiolar	00 – 01
Infiltrado Disperso na Mucosa	00 – 01

Adaptado de Galvão et.al., 2017

2. Para a análise em PAS

Tabela 4. Score Inflamatório PAS – Cavidade pulmonar

Número total de bronquíolos	Valor atribuído
00 – 05 bronquíolos	1
06 – 10 bronquíolos	2
11 – 15 bronquíolos	3
< 20 bronquíolos	4

Adaptado de Galvão et.al., 2017

3. Para a análise em Tricrômio de Gomori

Tabela 5. Score Inflamatório Tricrômio de Gomori – Cavidade pulmonar

Número total de estruturas peribronquiolo vasculares	Valor atribuído
00 – 05 bronquíolos	1
06 – 10 bronquíolos	2
11 – 15 bronquíolos	3
< 20 bronquíolos	4

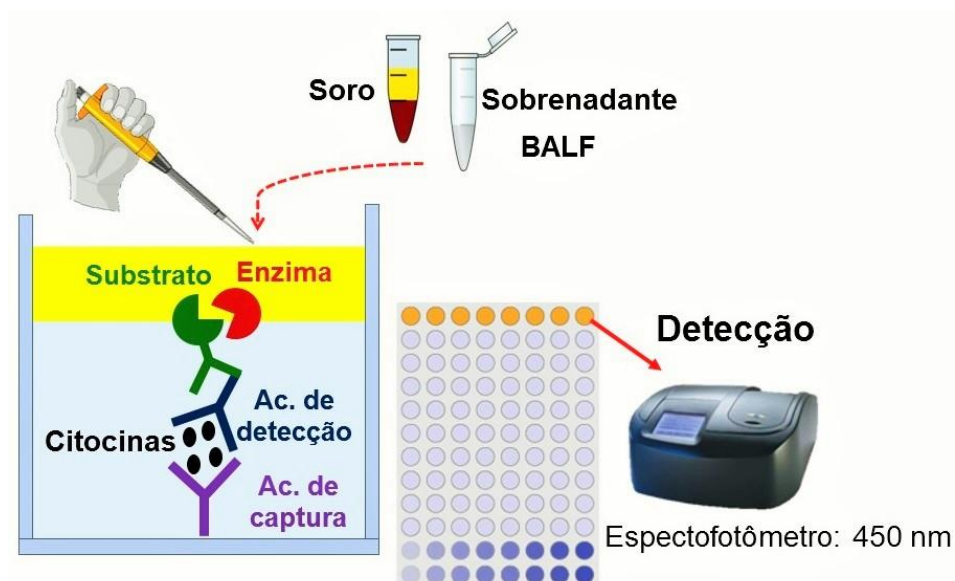
Adaptado de Galvão et.al., 2017

4.8. Quantificação de IgE e Citocinas

Para a quantificação da IgE, no 43º dia do protocolo, 24 horas após o último desafio, o sangue foi coletado pelo plexo braquial dos grupos experimentais para a obtenção do soro. Após os camundongos serem anestesiados, foi efetuado um corte no plexo braquial e o sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur, pelo qual foi aspirado cerca de 500 a 1000 µL de sangue. O sangue foi armazenado em tubos do tipo eppendorf inclinados a 45º e estocados em geladeira por cerca de 4 horas, para facilitar formação dos coágulos e coleta dos soros que foi realizada após a centrifugação do sangue por 300 g, a 4°C por 10 min. Em seguida, os soros foram alicotados, etiquetados e congelados a -20 °C para serem utilizados no ensaio imunoenzimático ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

As citocinas IL-4, IL-13, IFN-γ e IL-10, presentes no BALF de camundongos sensibilizados e desafiados, que foram congeladas a -20 C, foram quantificadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). A **Figura 7** ilustra de forma simplificada o protocolo da técnica ELISA sanduíche utilizada para dosagem de IgE e Citocinas neste trabalho.

Figura 4. Esquema representativo do protocolo de dosagem de IgE e Citocinas utilizando o método de ELISA sanduíche

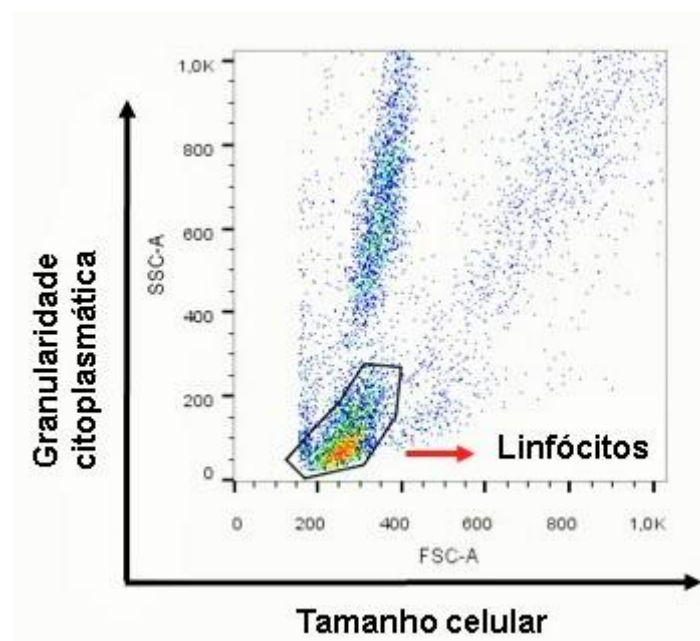


4.9. Marcação Celular (ativação do fator de transcrição NF-κB)

A análise celular por citometria de fluxo permite a distinção de populações celulares heterogêneas a partir de parâmetros como “forward-scattered light” (FSC) e “side-scattered light” (SSC), os quais distinguem as células pelo tamanho (difração da luz) e granularidade (difusão da luz), respectivamente (VAN RIJT et al., 2004). Portanto, a metodologia de citometria de fluxo foi utilizada para avaliação da expressão da porção ativa p65 do fator de transcrição NF-κB, essencial para síntese de citocinas.

O BALF coletado, depois de ser centrifugado, retirado o sobrenadante e ressuspenso em volume calculado para 5×10^5 células/mL de HBSS+/- gelado, homogeneizado e destinado a análise nos parâmetros FSC e SSC no citômetro de fluxo, onde para o marcador avaliado foi utilizado anticorpo e marcação fluorescente para tal, o protocolo específico para marcação foi realizado de acordo com as normas do Kit do fabricante utilizado (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Na **Figura 8** está demarcada a população de linfócitos que utilizamos para analisar a ativação do Fator de Transcrição NF-κB neste estudo.

Figura 5. População de Linfócitos demarcada para análise da ativação do Fator de Transcrição NF-κB



4.10. Análise Estatística

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 7.0 e valores com $p < 0,05$, considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Para analisar os dados do Citometro de Fluxo foi utilizado o programa FlowJo versão 10. Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e analisados empregando-se o teste estatístico T Student (não pareado).

RESULTADOS

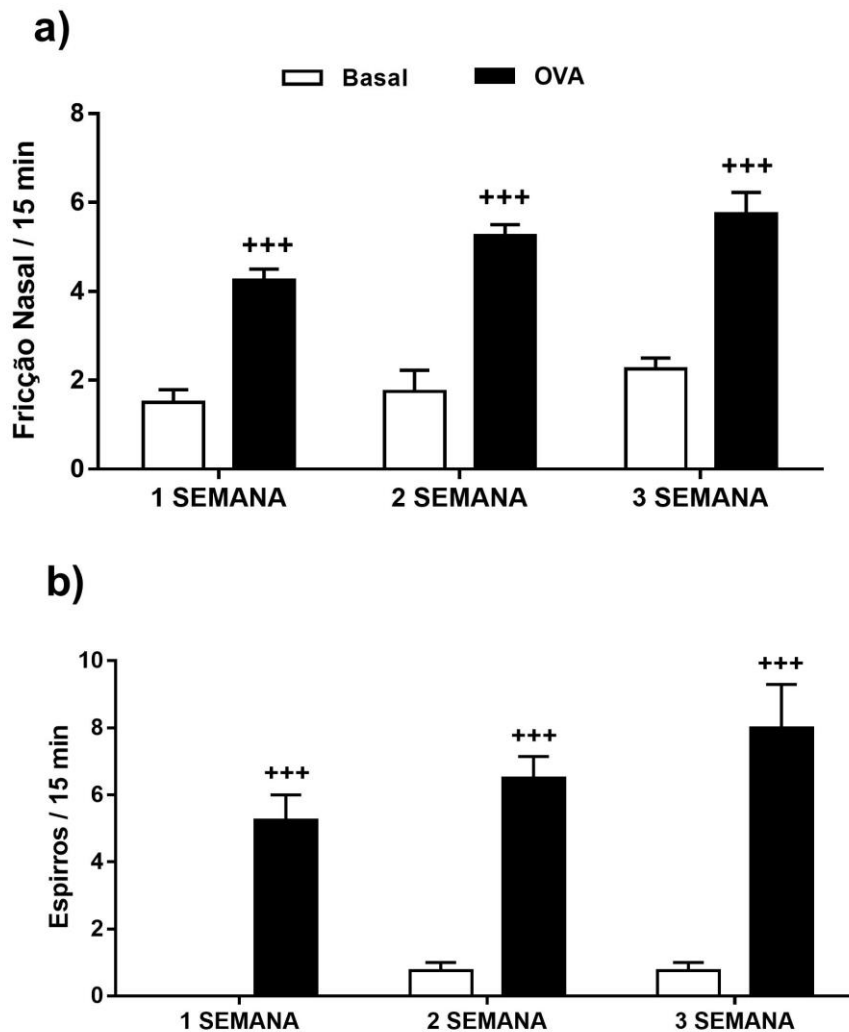
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio intranasal com Ovalbumina

O **Gráfico 1a** expressa o sintoma clínico da rinite, fricção nasal, quantificado por 15 minutos, logo após o desafio, por instilação nasal, com o alérgeno (OVA), uma vez por semana, durante as três semanas consecutivas. Em todas as semanas avaliadas o grupo OVA apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) no número de fricções nasais nos animais, quando comparado ao grupo Basal (1ª semana: $4,25 \pm 0,25$ vs $1,5 \pm 0,289$, respectivamente. 2ª semana: $5,25 \pm 0,25$ vs $1,75 \pm 0,479$, respectivamente. 3ª semana: $5,75 \pm 0,479$ vs $2,25 \pm 0,25$, respectivamente).

A quantificação do sintoma clínico: espirros está expressa no **Gráfico 1b**. Este foi quantificado no mesmo momento e da mesma forma que a fricção nasal. Em todas as semanas avaliadas o grupo OVA apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de espirros, quando comparado ao grupo Basal (1ª semana: $5,25 \pm 0,75$ vs 0 ± 0 , respectivamente. 2ª semana: $6,5 \pm 0,645$ vs $0,75 \pm 0,25$, respectivamente. 3ª semana: $8 \pm 1,29$ vs $0,75 \pm 0,25$, respectivamente).

Gráfico 1. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio intranasal com Ovalbumina

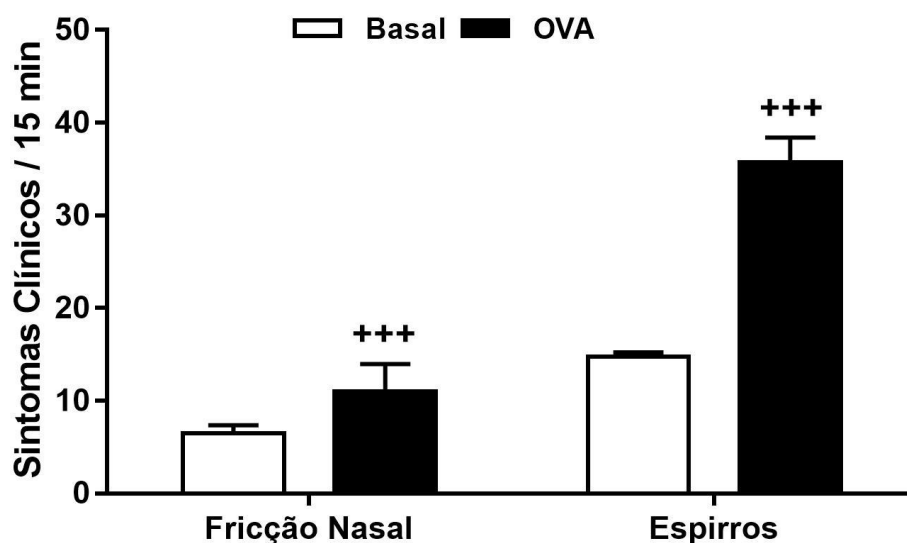


Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. Nos dias 23, 30 e 37 do protocolo experimental da CARAS, logo após o desafio com o alérgeno, os sintomas clínicos nasais foram quantificados por 15 minutos. **(a)** Fricção Nasal e **(b)** Espirros. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. ⁺⁺⁺p < 0,001, quando comparado ao grupo Basal.

5.2. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio aerossol com Ovalbumina, na fase crônica da inflamação alérgica

O **Gráfico 2** expressa os sintomas clínicos: fricção nasal e espirros, quantificados por 15 minutos, logo após o último desafio com o alérgeno OVA, por aerossol, na última semana do protocolo caracterizada como a fase crônica da inflamação alérgica. Foi observado que o grupo OVA apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) no número de fricção nasal, quando comparado ao grupo Basal (Basal: $6,5 \pm 0,866$ vs OVA: $11 \pm 2,97$). De forma semelhante foi também observado no sintoma clínico: espirros, quando comparado ao grupo Basal (Basal: $14,8 \pm 0,479$ vs OVA: $35,8 \pm 2,66$ $p < 0,001$).

Gráfico 2. Avaliação dos sintomas clínicos da rinite no modelo experimental da CARAS, induzidos pelo desafio aerossol com Ovalbumina, na fase crônica da inflamação alérgica



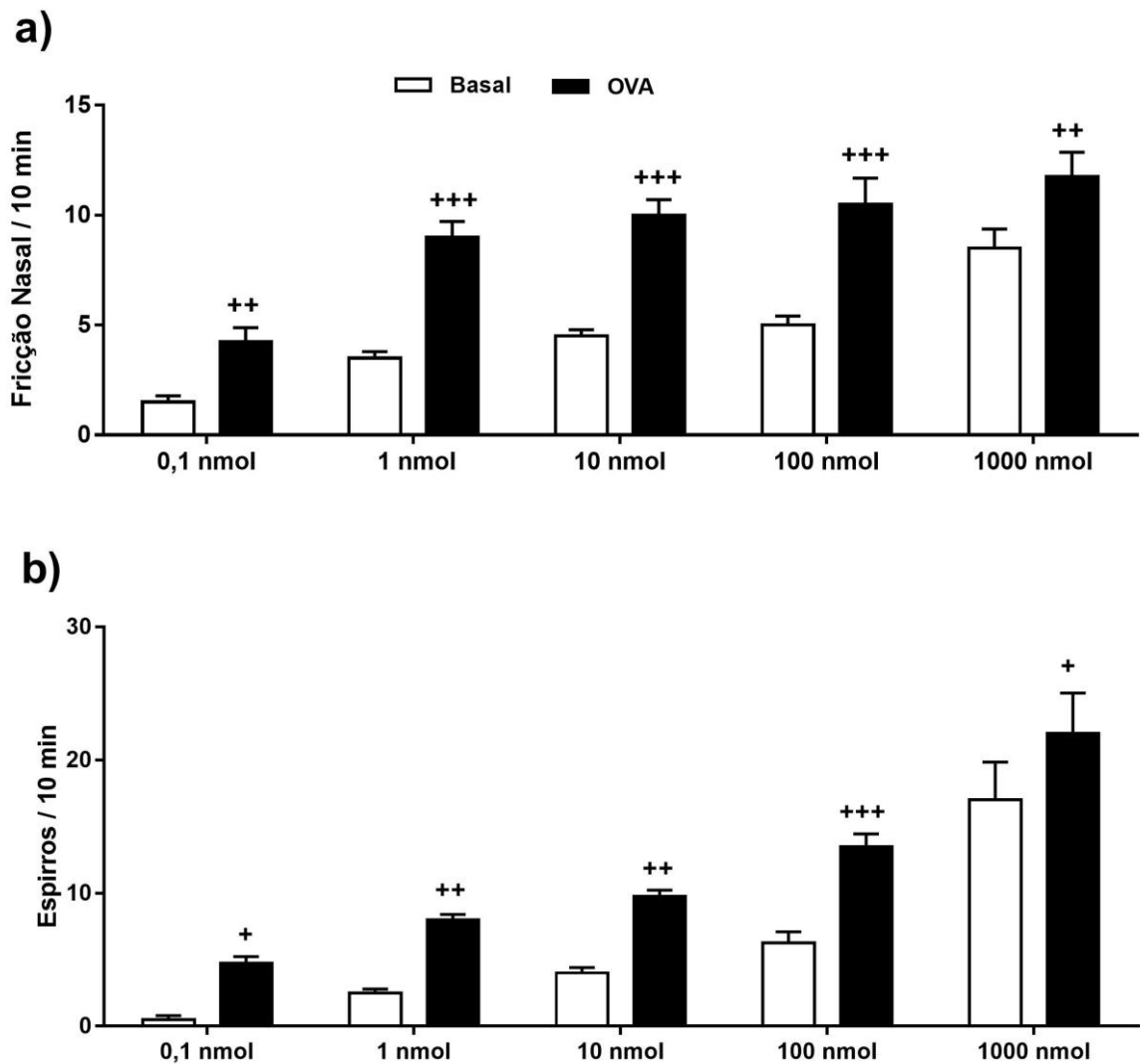
Camundongos BALB/c fêmeas ($n=6$) foram sensibilizados e desafiados com OVA. No dia 43 do protocolo experimental da CARAS. Logo após o último desafio com o alérgeno, por aerossol, os sintomas clínicos nasais foram quantificados por 15 minutos: Fricção Nasal e Espirros. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. $+++p < 0,001$, quando comparado ao grupo Basal.

5.3. Avaliação da reatividade nasal a Histamina no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina

A reatividade nasal a histamina foi determinada pela quantificação dos sintomas clínicos, fricção nasal e espirros, e está expressa no **Gráfico 3**. Em relação a fricção nasal (**Gráfico 3a**), o grupo OVA, sensibilizado e desafiado com Ovalbumina, apresentou um aumento significativo no número de fricções nasais, após as administrações com histamina, quando comparado ao grupo Basal (em 0,1 nmol: $4,5 \pm 0,629$ vs $1,5 \pm 0,289$, $p < 0,01$; em 1 nmol: $9 \pm 0,707$ vs $3,5 \pm 0,289$, $p < 0,001$; em 10 nmol: $10 \pm 0,707$ vs $4,5 \pm 0,289$, $p < 0,001$; em 100 nmol: $10,5 \pm 1,19$ vs $5 \pm 0,408$, $p < 0,001$ e em 1000 nmol: $11,8 \pm 1,11$ vs $8,5 \pm 0,866$, $p < 0,01$, respectivamente).

A quantificação dos espirros (**Gráfico 3b**) no grupo OVA, apresentou aumento significativo em relação ao grupo Basal (em 0,1 nmol: $4,75 \pm 0,479$ vs $0,5 \pm 0,289$, $p < 0,05$; em 1 nmol: $8 \pm 0,408$ vs $2,5 \pm 0,289$, $p < 0,01$; em 10 nmol: $9,75 \pm 0,479$ vs $4 \pm 0,408$, $p < 0,01$; em 100 nmol: $13,5 \pm 0,957$ vs $6,25 \pm 0,854$, $p < 0,001$ e em 1000 nmol: $22 \pm 3,03$ vs $17 \pm 2,86$, $p < 0,05$, respectivamente).

Gráfico 3. Avaliação da reatividade nasal a Histamina no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. No dia 37 do protocolo experimental da CARAS, 1 hora após o desafio com o alérgeno, a reatividade nasal a histamina foi analisada através da instilação de doses crescentes de histamina a cada hora, por cinco horas consecutivas. Os sintomas clínicos nasais foram quantificados por 10 minutos logo após cada desafio. **(a)** Fricção Nasal e **(b)** Espirros. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. ⁺p < 0,05; ⁺⁺p < 0,01; ⁺⁺⁺p < 0,001, quando comparado ao grupo Basal.

5.4. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Nasal (NALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina

As células totais ($10^5/\text{mL}$) presentes no NALF estão expressas no **Gráfico 4a**. O grupo OVA apresentou um aumento significativo no número de células totais presentes no NALF, quando comparado ao grupo Basal ($0,331 \pm 0,0389$ vs $0,075 \pm 0,0134$, $p < 0,001$).

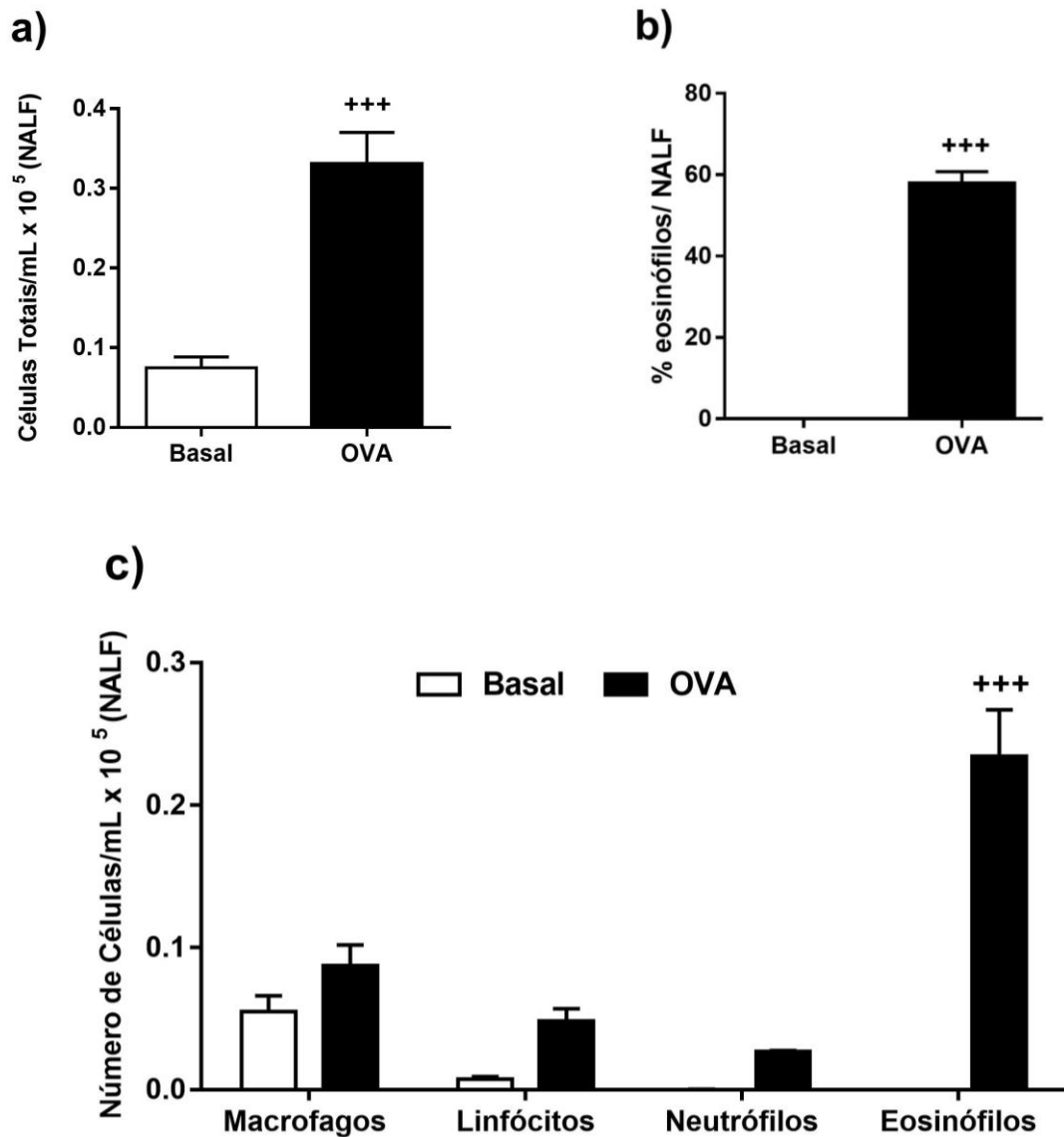
A porcentagem de eosinófilos (%) presentes no NALF dos animais está demonstrada no **Gráfico 4b**. A porcentagem dessas células no grupo OVA apresentou um aumento significativo no NALF dos animais, quando comparada a porcentagem do grupo Basal ($58 \pm 2,75$ vs 0 ± 0 , $p < 0,001$).

O número total ($10^5/\text{mL}$) das populações de leucócitos: macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no NALF dos animais, está expresso no **Gráfico 4c**. Não houve diferenças significantes, na população de macrófagos quando comparados ao grupo Basal ($0,0549 \pm 0,0111$ vs $0,0873 \pm 0,0145$, respectivamente).

Ao quantificar o número de linfócitos presentes no NALF dos animais (**Gráfico 4c**), observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais analisados (grupo Basal: $0,0075 \pm 0,00159$ e grupo OVA: $0,0481 \pm 0,00872$). O **Gráfico 4c** expressa ainda, a não diferença significativa no número de neutrófilos presentes no NALF dos grupos experimentais avaliados (Basal: $0,000125 \pm 0,000125$ e grupo OVA: $0,0268 \pm 0,000777$).

O número de eosinófilos presentes no NALF dos grupos experimentais está expresso na **Gráfico 4c**. O grupo OVA apresentou um aumento significativo do número de eosinófilos presente no NALF, quando comparado com o grupo Basal ($0,234 \pm 0,0327$ vs 0 ± 0 , respectivamente, com $p < 0,001$).

Gráfico 4. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Nasal (NALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. No último dia do protocolo experimental da CARAS foi realizada a coleta do Fluido do Lavado Nasal (NALF), uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação o *pellet* foi ressuspensão e citocentrifugado, corado pelo método de panótico, para contagem diferencial das populações celulares. **(a)** Células Totais **(b)** Porcentagem de Eosinófilos e **(c)** Células diferenciais: Macrófagos, Linfócitos, Neutrófilos e Eosinófilos. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. ⁺⁺⁺p < 0,001, quando comparado ao grupo Basal.

5.5. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina

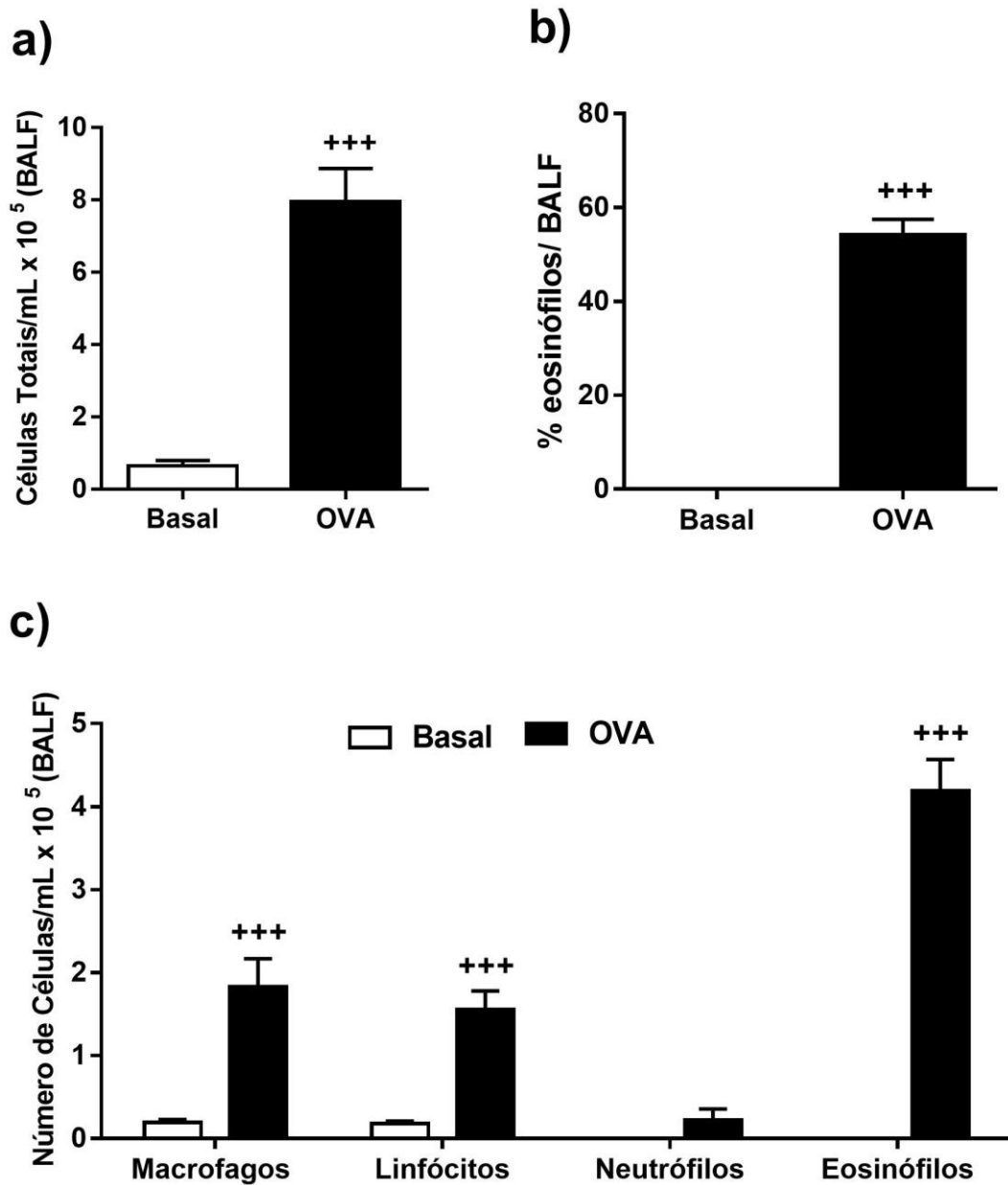
As células inflamatórias totais ($10^5/\text{mL}$) que migraram para o BALF estão expressas no **Gráfico 5a**. O grupo OVA apresentou aumento significativo no número de células totais presentes no BALF, quando comparado ao grupo Basal ($7,95 \pm 0,923$ vs $0,644 \pm 0,154$, com o $p < 0,001$). A porcentagem de eosinófilos presentes no BALF está demonstrada no **Gráfico 5b** e, como pode ser observado, está aumentada significativamente no BALF do grupo OVA quando comparada à do grupo Basal ($54,3 \pm 3,28$ vs 0 ± 0 , com o $p < 0,001$).

O número total ($10^5/\text{mL}$) das populações de leucócitos: macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no BALF está expresso no **Gráfico 5c**. O número de macrófagos presentes no BALF no grupo OVA, apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo Basal ($1,83 \pm 0,335$ vs $0,195 \pm 0,0337$, com o $p < 0,001$).

Na análise de linfócitos presente no BALF (**Gráfico 5c**) observa-se que o grupo OVA apresentou aumento significativo dessa população celular quando comparado ao grupo Basal ($1,55 \pm 0,225$ vs $0,178 \pm 0,0322$, com o $p < 0,001$).

Entretanto, ao quantificar o número de neutrófilos presentes no BALF (**Gráfico 5c**), observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais analisados (grupo Basal: $0,00175 \pm 0,00103$ e grupo OVA: $0,225 \pm 0,132$). Já o número de eosinófilos presentes no BALF (**Gráfico 5c**) apresentou aumento significativo no grupo OVA quando comparado com o grupo Basal ($4,19 \pm 0,0357$ vs 0 ± 0 , com o $p < 0,001$).

Gráfico 5. Avaliação da migração de células totais, porcentagem de eosinófilos e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. No último dia do protocolo experimental da CARAS foi realizada a coleta do Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação o *pellet* foi ressuspenso e citocentrifugado, corado pelo método de panótico, para contagem diferencial das populações celulares. **(a)** Células Totais **(b)** Porcentagem de Eosinófilos e **(c)** Células diferenciais: Macrófagos, Linfócitos, Neutrófilos e Eosinófilos. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. ⁺⁺⁺p < 0,001, quando comparado ao grupo Basal.

5.6. Avaliação dos parâmetros histopatológicos observados no tecido da cavidade nasal dos animais com CARAS

Na **Figura 6**, pode-se observar o processo histopatológico característico da inflamação crônica nas vias aéreas superiores presente no modelo experimental da CARAS no grupo OVA. A coloração Hematoxilina & Eosina (HE) permite a observação da arquitetura íntegra da cavidade nasal que está evidenciada no grupo Basal. No grupo OVA, observa-se um infiltrado inflamatório, além de necrose do epitélio respiratório (estrela negra de 5 pontas ★).

Observa-se, no **Gráfico 6**, nos tecidos nasais, que a inflamação tecidual foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) no grupo OVA em relação ao grupo Basal ($9,4 \pm 0,4$ vs $1,67 \pm 0,333$, respectivamente).

Figura 6. Avaliação dos parâmetros histopatológicos no tecido da cavidade nasal dos animais com CARAS

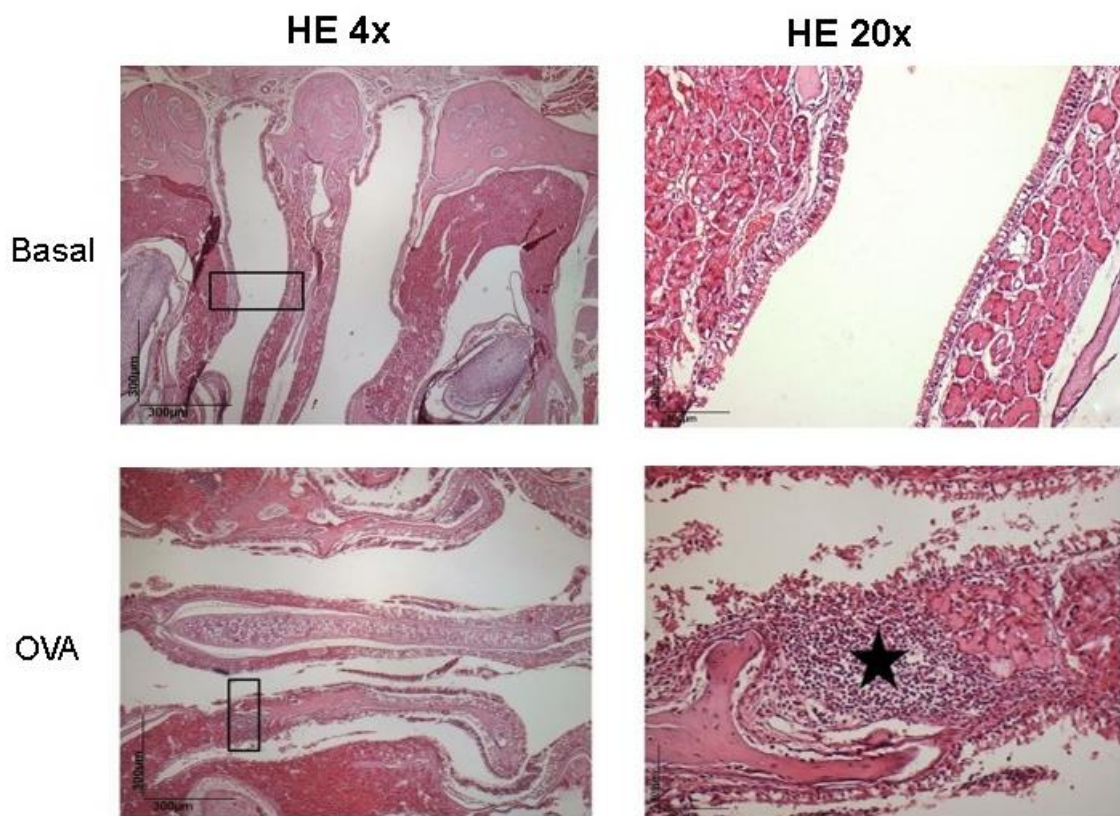
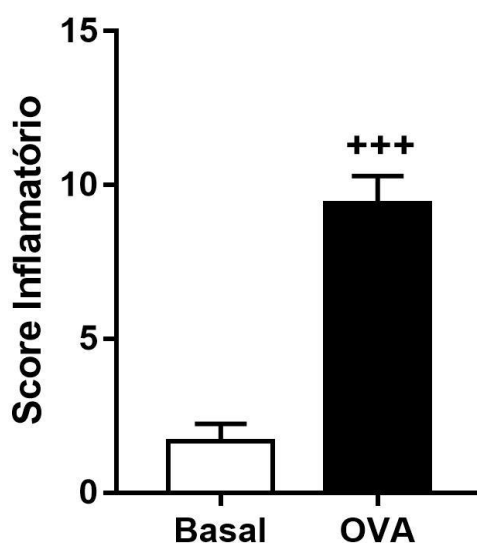


Gráfico 6. Score Inflamatório HE (Cavidade nasal)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. A cavidade nasal dos animais foi coletada 24h após o último desafio. E foi submetida a técnica histológica e coloração por HE. Os parâmetros inflamatórios observados são: infiltrado inflamatório; destruição do epitélio nasal; edema de mucosa e vasodilatação. Tecidos corados por HE, vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 4x e de 20x. No score que representa os valores atribuídos finais como uma somatória das lesões avaliadas, os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. $+++p < 0,001$, comparado ao grupo Basal.

5.7. Avaliação dos parâmetros histopatológicos no tecido da cavidade pulmonar dos animais com CARAS

Na **Figura 7**, observa-se o processo histopatológico característico da inflamação alérgica crônica das vias aéreas inferiores, presente no modelo experimental da CARAS. A coloração HE permite também a observação da arquitetura geral do tecido pulmonar, revelando o padrão típico do epitélio respiratório, onde se apresenta de forma preservada no grupo Basal. No entanto, no grupo OVA, observam-se a presença de infiltrado inflamatório celular e edema multifocal peribronquiolovascular (triângulo amarelo ▲), compondo o exsudato característico da inflamação pulmonar alérgica, observa-se ainda hipertrofia e hiperplasia do epitélio bronquiolar (seta verde ←), e presença de tampão mucoso no interior de bronquíolos.

O Ácido Periódico de Schiff (PAS) revela glicogênio e mucina intracelular, além da hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes (seta azul →), lesões

observadas no grupo OVA, diferente do grupo Basal, onde essas estruturas mantiveram-se sem alteração. Nos tecidos corados com PAS, observamos a presença de muco (glicogênio ou polissacarídeos neutros (contendo grupos 1,2 glicol) e mucina (glicoproteína, principal constituinte do muco) (triângulo azul ▲).

O Tricrômico de Gomori (TG) permitiu a observação do remodelamento da cavidade pulmonar, evidenciando o colágeno, o qual está intimamente relacionado ao processo de fibrose (seta laranja ▼) no grupo OVA, o que não foi observado de maneira predominante no grupo Basal.

Pode-se observar, tanto visualmente, representado na **Figura 7**, quanto estatisticamente, através do **Gráfico 7**, que houve migração significativa de células inflamatórias para o espaço peribronquiolovascular no grupo OVA em relação ao Basal ($6,75 \pm 0,25$ vs 1 , com o $p < 0,001$) observados em HE, hiperprodução de muco pelas células caliciformes, ($2,5 \pm 0,289$ vs $0,5 \pm 0,289$, com o $p < 0,001$) observada em PAS, além de expansão da matriz extracelular no espaço peribronquiolovascular, promovendo remodelamento tecidual, ($1,75 \pm 0,25$ vs 0 ± 0 , com o $p < 0,001$).

Figura 7. Avaliação dos parâmetros patológicos no tecido da cavidade pulmonar, característicos da CARAS induzida por Ovalbumina, evidenciado no processo inflamatório da asma alérgica crônica

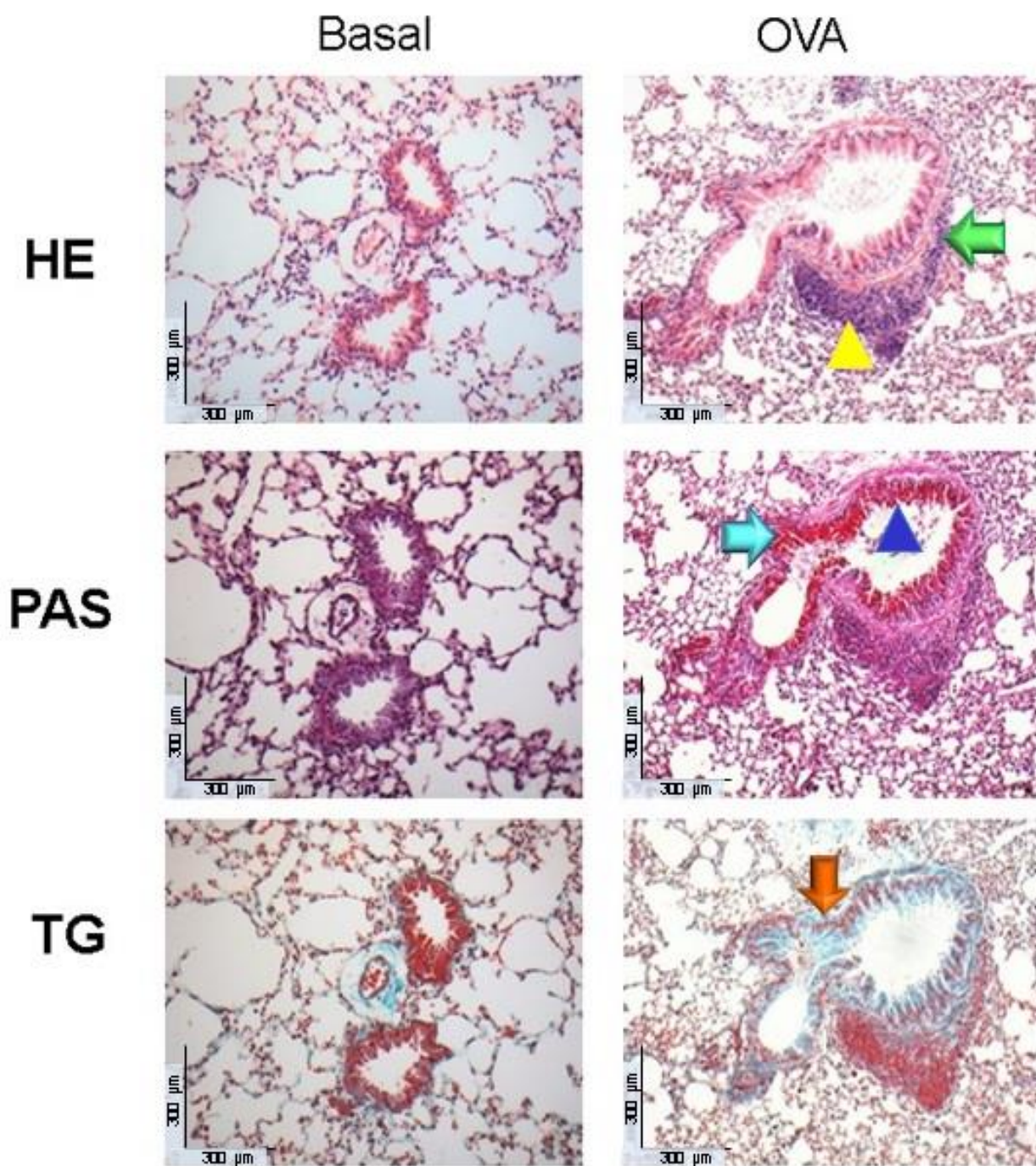
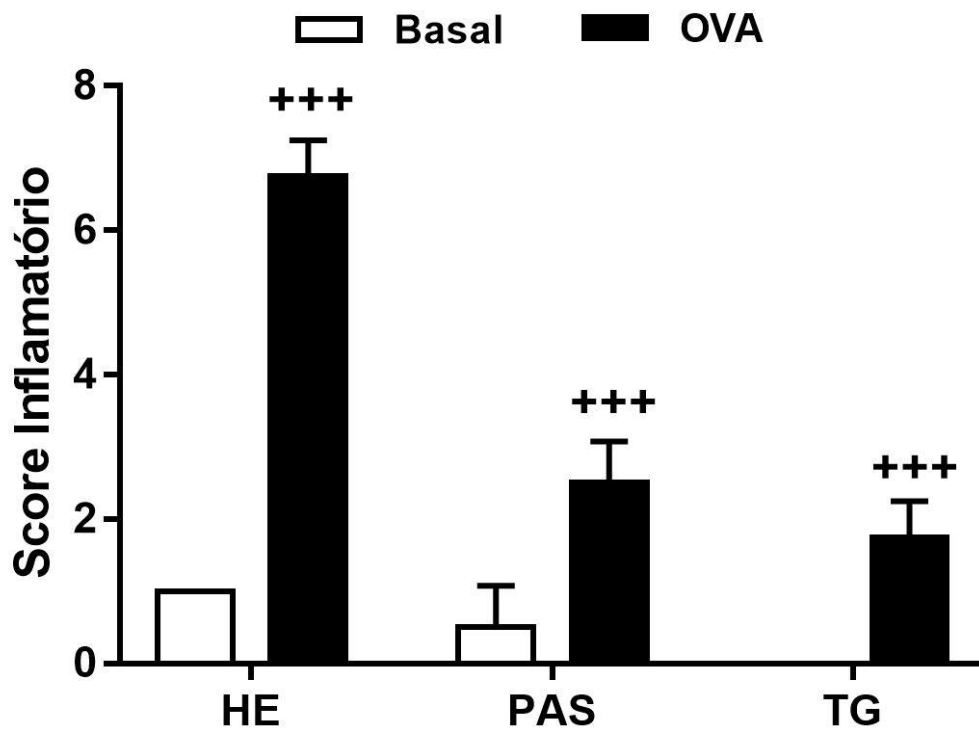


Gráfico 7. Score inflamatório PAS (Cavidade pulmonar)

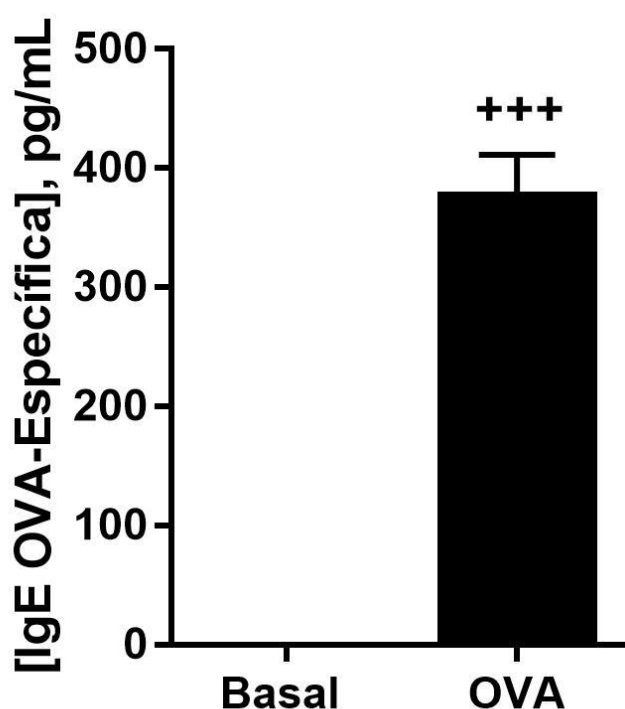


Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. O pulmão dos animais foi coletado 24h após o último desafio. O pulmão foi submetido a técnica histológica e coloração por HE, PAS E TG. Os parâmetros observados foram: Infiltrado Peribroquiolo vascular; Hipertrofia e Hiperplasia de Células Caliciformes; Tampão Mucoso; Infiltrado Perivascular; Infiltrado Peribronquiolar e Infiltrado Disperso na Mucosa, além da observação de estruturas peribroquiolo vasculares no TG. No score que representa os valores atribuídos finais como uma somatória das lesões avaliadas, os resultados foram expressos como média ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. +++p < 0,001, comparado ao grupo Basal.

5.8. Avaliação da produção de IgE, característica do modelo experimental da CARAS induzida por Ovalbumina

O **Gráfico 8** demonstra que o animal OVA, por ser exposto ao alérgeno, no primeiro momento durante a sensibilização e em seguida durante os desafios, quer seja intranasal ou por aerossol, apresentou produção significativa de IgE OVA-específica ($378 \pm 33,8$ vs 0 ± 0 , $p < 0,001$, em relação ao grupo Basal). Já o grupo Basal não apresentou concentração dessa Imunoglobulina, uma vez que esses animais não entraram em contato com a OVA.

Gráfico 8. Avaliação da produção de IgE, característica do modelo experimental da CARAS induzida por Ovalbumina



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. O soro dos animais foi coletado 24h após o último desafio. A quantificação da IgE OVA-específica foi realizada pelo Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA sanduíche. Concentração de IgE OVA-Específica por pg/mL. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student $+++p < 0,001$, quando comparado ao grupo Basal.

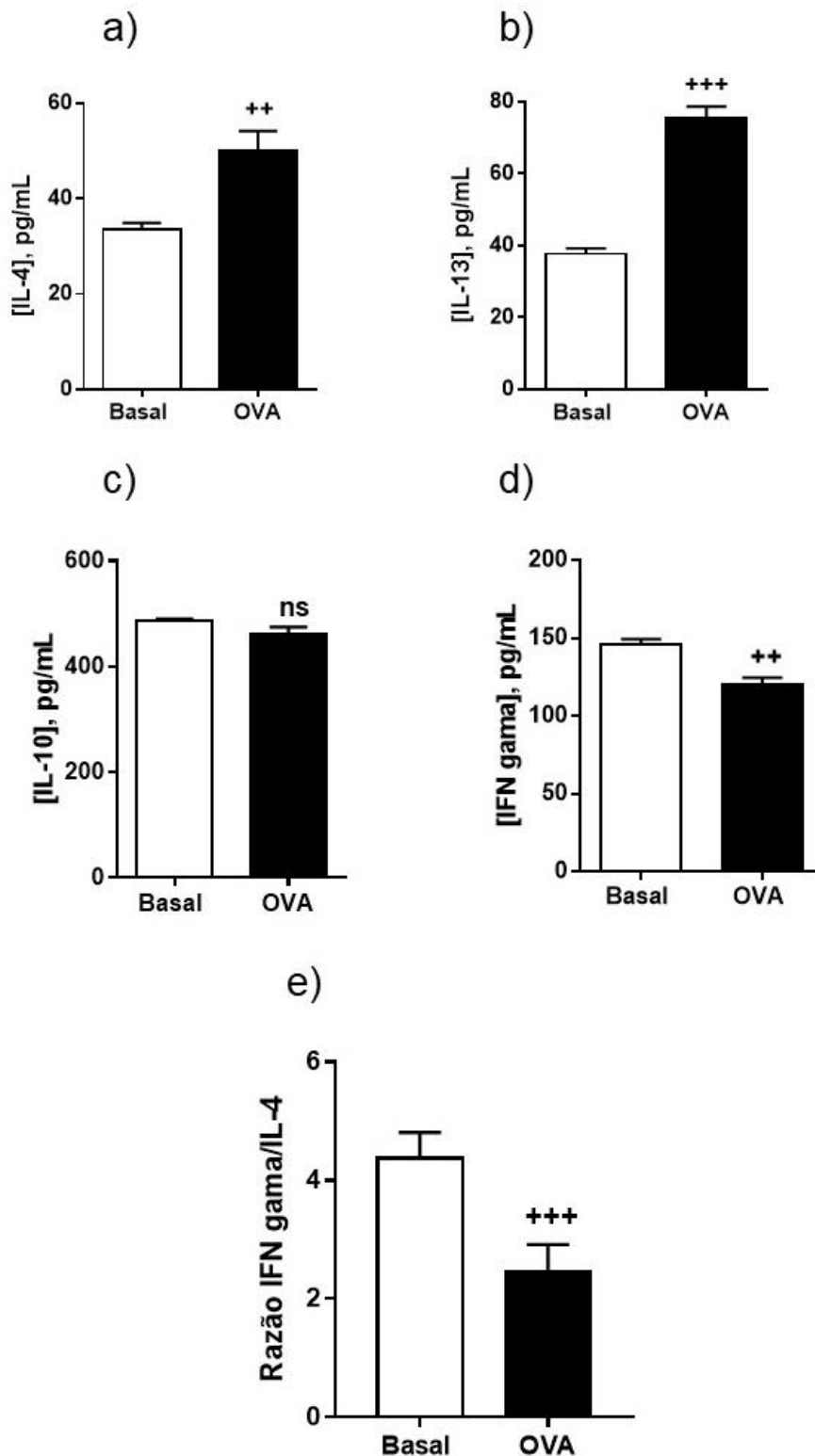
5.9. Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-13, IFN γ e IL-10 no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina

A quantificação da IL-4 no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) está demonstrada no **Gráfico 9a**. A sensibilização e desafio com OVA promoveu aumento significativo desta citocina, em relação ao grupo Basal ($50 \pm 4,23$ vs $33,5 \pm 1,39$, respectivamente, $p < 0,01$). O grupo OVA apresentou aumento significativo da produção de IL-13, quando comparada ao grupo Basal ($75,4 \pm 3,21$ vs $37,7 \pm 1,49$, respectivamente, $p < 0,001$) (**Gráfico 9b**).

Entretanto, o processo de sensibilização e desafio com OVA promoveu diminuição significativamente da produção do IFN γ , quando comparado com grupo Basal ($120 \pm 4,3$ vs $146 \pm 3,32$, respectivamente, $p < 0,01$) (**Gráfico 9c**). Já a produção da IL-10 não foi alterada pelo desafio com OVA (grupo OVA) quando comparado com o grupo Basal (461 ± 14 vs $486 \pm 4,77$, respectivamente) (**Gráfico 9d**)

O **Gráfico 9e** expressa a razão IFN γ /IL-4. A sensibilização e desafio com o alérgeno OVA, promoveu diminuição significativa dessa razão entre os grupos OVA/Basal ($2,47 \pm 0,2$ vs $4,38 \pm 0,195$, respectivamente, $p < 0,001$). Este resultado indica uma diminuição da proporção do perfil T_H1 em relação ao perfil T_H2 no processo fisiopatológico da CARAS.

Gráfico 9. Avaliação da produção das citocinas IL-4, IL-13, IFN γ e IL-10 no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. O BALF dos animais foi coletado 24h após o último desafio, foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação das citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA sanduíche. **(a)** IL-4 por pg/mL. **(b)** IL-13 por pg/mL. **(c)** IFN γ por pg/mL. **(d)** IL-10 por pg/mL. **(e)** Razão IFN γ / IL-4. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. **p< 0,01 e ***p< 0,001 quando comparado ao grupo Basal.

5.10. Avaliação da expressão do Fator de Transcrição NF- κ B no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina

Para confirmar o mecanismo imunomodulador e fisiopatológico determinante envolvido no modelo experimental da CARAS, avaliamos, pela técnica de citometria de fluxo, a expressão/ativação do fator de transcrição NF- κ B em linfócitos do BALF.

A **Figura 8** e o **Gráfico 10** ilustram o histograma representativo e o gráfico utilizado para analisar a porcentagem da população de linfócitos positivos para a expressão do NF- κ B p65. Os resultados representam a relação da porcentagem de fluorescência da população de células entre os grupos Basal e OVA (**Figura 8**). As porcentagens obtidas foram analisadas estatisticamente e estão expressas no **Gráfico 10**. O grupo OVA apresentou um aumento significativo na expressão da porção ativa, p65, do NF- κ B em comparação com o grupo Basal ($93,1 \pm 2,33$ vs $54,1 \pm 0,581$, respectivamente. Onde o $p < 0,01$).

Figura 8. Avaliação da ativação do Fator de Transcrição NF- κ B no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina

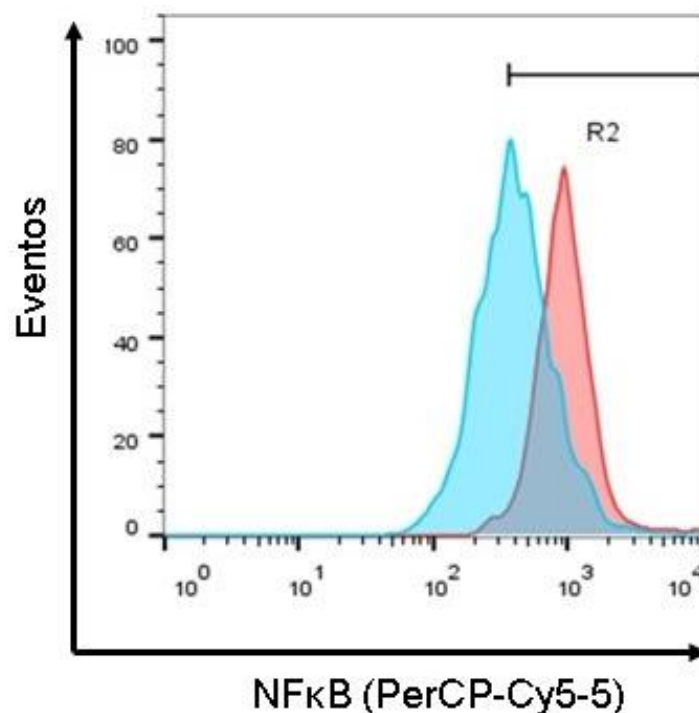
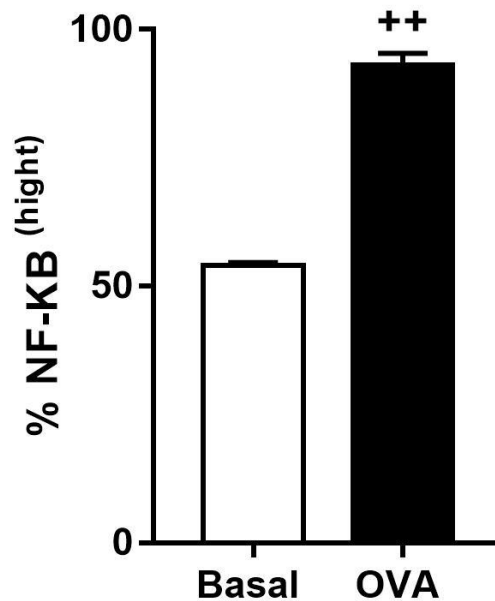


Gráfico 10. Avaliação da ativação do Fator de Transcrição NF-κB no modelo experimental da CARAS, induzida por Ovalbumina



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com OVA. O BALF dos animais foi coletado 24h após o último desafio. A expressão do NF-κB p65 foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. O histograma (a) representa o número de eventos em função da fluorescência do NF-κB (PerCP-Cy5-5), as células analisadas são os linfócitos. O pico com coloração azul é correspondente ao grupo Basal e o pico com coloração rosa é correspondente ao grupo OVA. Os histogramas são representativos de um experimento (b) A porcentagem do NF-κB. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t student. ++ p<0,01.



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) é uma doença que abrange as vias aéreas superior e inferior. Cerca de 25% da população mundial apresenta rinite e mais de 300 milhões de pessoas sofrem com asma (BROŽEK et al., 2017; GINA, 2017; OMS, 2017). O Brasil está no grupo de países que apresenta as maiores taxas de prevalência de asma e rinite alérgica (ASBAI, 2018). Tendo em vista a abrangência mundial da asma e RA combinadas, modelos experimentais que as interliguem é extremamente relevante para o esclarecimento da patogênese, elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos, prevalência da sintomatologia evidenciada na clínica e estabelecimento de medicamentos que auxiliam no tratamento das duas patologias. Na literatura, até o presente momento, existem cinco trabalhos que utilizam protocolos da CARAS experimental (LI et al., 2015, 2016; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016), por isso, é importante a implantação de modelos experimentais, em laboratórios de pesquisa, que mimetizem essa síndrome para melhor compreender o desenvolvimento destas doenças.

No presente estudo foram utilizados dois grupos experimentais: Basal e OVA, de forma que o grupo Basal se caracteriza por serem animais saudáveis, mimetizando o organismo fisiológico, sem alterações patológicas e que não entraram em contato com o alérgeno OVA, não desencadeando o processo inflamatório da CARAS. A utilização desse grupo é necessária para que, no modelo experimental da doença, seja possível analisar os níveis basais/fisiológicos dos parâmetros característicos da síndrome, tais como: sintomas clínicos, migração celular, histologia, produção de IgE e citocinas, bem como ativação de fatores nucleares. Já o grupo OVA se caracteriza por serem animais doentes, ou seja, que entraram em contato com o alérgeno e desencadearam todo o processo fisiopatológico da CARAS, tornando a análise comparativa entre esses dois grupos fundamental para a comprovação da implantação do modelo experimental da CARAS, no Laboratório de Imunofarmacologia da UFPB.

A rinite é caracterizada pelo aumento dos sintomas clínicos: espirros e prurido (coceira/fricção nasal), resultantes de um processo inflamatório e/ou disfunção da mucosa nasal (MELTZER et al., 2012; VUURMAN et al., 2014). Este é decorrente da destruição do epitélio respiratório, principalmente pelo processo inflamatório instalado, onde as terminações nervosas são expostas e as fibras

nervosas sensoriais são excitadas por estímulos inespecíficos e estimulam fibras eferentes sensíveis, aferentes e circundantes. Isso faz com que as fibras do nervo sensorial secretem substâncias que induzem a contração de músculos lisos, a secreção de muco pelas células caliciformes e exsudação de plasma a partir de capilares (TOGIAS, 2000; WHEATLEY; TOGIAS, 2015). A vasodilatação provocada pelo processo inflamatório iniciado, bem como a ligação de mediadores a receptores sensoriais, como a histamina, provoca o prurido e o espirro, de forma que, ao aumentar o estímulo, maior e mais constante será a frequência destes sinais (SIMONS; SIMONS, 2011; XU; ZHANG; WANG, 2014).

Nosso trabalho demonstrou a implantação apropriada do modelo experimental da CARAS no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) na UFPB com o aumento do prurido nasal, bem como do espirro, a partir da primeira semana após o desafio alergênico. Os modelos experimentais de rinite induzidos por OVA, apresentados na literatura, se caracterizam pelo aumento nos sintomas clínicos, inferindo a instalação da rinite experimental (KUYAMA et al., 2010b; LI et al., 2015, 2016, ZHANG et al., 2017, 2016). É possível observar que os sintomas apresentados pelos animais são evidenciados durante todo o protocolo, tanto no desafio por via intranasal como por aerossol com a OVA, confirmando a cronicidade desta doença.

A hiper-reatividade nasal não específica é uma das características clínicas da inflamação alérgica na rinite. Devido à infiltração eosinofílica e destruição da mucosa nasal, esta torna-se hiper-reativa a estímulos normais tais como microrganismos, poluentes e fatores ambientais causando os sintomas nasais (AMIN, 2015; EL-SHAZLY et al., 2017; HOWARTH, 2000; MULLARKEY, 1988). Para avaliar, experimentalmente, a reatividade nasal é utilizada a histamina (molécula pré-estocada nos mastócitos e basófilos) que tem sua ação exacerbada no processo inflamatório. A histamina é responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo neurotransmissão, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de estar envolvida no início das reações alérgicas e inflamatórias. Os efeitos da histamina são mediados por receptores do tipo H1, H2, H3 e H4 que são acoplados à proteína G. Os receptores H1 e H2 são responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela histamina (SHAKOORY et al., 2004; SIMONS; SIMONS, 2011; WERNERSSON; PEJLER, 2014).

Na resposta alérgica, a ativação cruzada de receptores FcεRI presentes em mastócitos/basófilos/eosinófilos, associados às IgE alérgeno-específica, pelo alérgeno ativam a fosfolipase C (PLC), culminando no aumento da concentração de

cálcio intracelular e fusão das membranas das vesículas contendo grânulos histamínicos e promove sua atuação em seus receptores presentes nas fibras c neuronais, de forma a ocasionar os sintomas clínicos de fricção nasal e espirros (WERNERSSON; PEJLER, 2014). Durante o processo inflamatório na cavidade nasal, maior será a prevalência de mastócitos, de forma a aumentar a presença e liberação de seus grânulos histamínicos. Quando o indivíduo apresenta um processo efetivo de sensibilização torna-se mais responsivo ao alérgeno (AMIN, 2012; GALLI; TSAI, 2012).

Observamos que os animais sensibilizados com a OVA apresentaram os sintomas clínicos avaliados nas menores concentrações de histamina, confirmando a reatividade da mucosa nasal e efetividade do processo de sensibilização mastocitária tecidual nasal ao alérgeno. A literatura mostra que os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento dos sintomas clínicos em todas as concentrações instiladas de histamina, corroborando com os nossos resultados (KUYAMA et al., 2010b). Observamos também que, apenas, na maior concentração de histamina, os animais do grupo basal apresentaram aumento dos sintomas clínicos, demonstrando que fisiologicamente o organismo não é reativo ao mediador inflamatório, apenas em condições patológicas, ou seja, em concentrações elevadas de histamina liberadas pelos mastócitos ativados pelo processo de sensibilização.

Um dos parâmetros característicos do processo inflamatório crônico alérgico, evidenciado pela presença do perfil T_H2 , é a migração leucocitária para o tecido inflamado. Os leucócitos presentes, incluindo macrófagos, linfócitos, basófilos e mastócitos, são responsáveis por promover e manter o processo inflamatório ativo (DJUKANOVIĆ et al., 1990; HOLGATE et al., 2015).

Os linfócitos T $CD4^+$ tem como função principal manter o perfil de células inflamatórias e, quando diferenciados em T_H2 , caracterizam o processo alérgico instalado. A apresentação antigênica sinaliza para a polarização ao perfil alérgico (T_H2), estimulando a liberação de citocinas que mantém toda a resposta imune ativa com, conseqüente, manutenção do processo inflamatório (AMIN, 2016; KAY, 2006; LLOYD; HESSEL, 2010).

A principal célula efetora do perfil T_H2 (resposta imune tipo 2) é o eosinófilo (GEORGE; BRIGHTLING, 2016b; POSSA et al., 2013), sendo um sinal marcante de desordens alérgicas (BEZERRA-SANTOS et al., 2006; POSSA et al., 2013). O processo inflamatório alérgico nas vias aéreas induz a degranulação dos eosinófilos

e a liberação de proteases, como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica de eosinófilos (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), agentes quimiotáticos (CCL5/RANTES e CCL11/ eotaxina-1), citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-16, IL-25), fatores de crescimento como o fator de necrose tumoral TNF- α , fator de crescimento transformante (TGF α/β), CCL5 (DAVOINE; LACY, 2014) e derivados lipídicos envolvidos na hiperresponsividade das vias aéreas e danos ao tecido (GEORGE; BRIGHTLING, 2016b; PELAIA et al., 2015; ROSENBERG; PHIPPS; FOSTER, 2007; WARDLAW, 1999). A IL-4 e IL-13 participam da indução do processo de quimiotaxia e transmigração eosinofílica (GEORGE; BRIGHTLING, 2016b; WOLTMANN et al., 2000) para as vias aéreas (HIRAI et al., 2001; MESQUITA-SANTOS et al., 2006; MUTALITHAS et al., 2010; SMIT; LUKACS, 2006).

Outro leucócito importante no processo inflamatório crônico das vias aéreas é o macrófago. A ILC-2 pode promover a ativação alternativa dos macrófagos, diferenciando-os em macrófagos do tipo 2 (M2) que irão contribuir para o remodelamento da parede das vias aéreas por induzir a síntese de colágeno, devido a produção de fatores de crescimento (TGF- β , PDGF) que estimulam as células epiteliais e fibroblastos (VAN DYKEN et al., 2014). As citocinas IL-4 e IL-13 também são importantes reguladores da diferenciação desse subtipo de ativação alternativa dos M2 (GOUR; WILLS-KARP, 2015).

No nosso trabalho, observamos que os animais do grupo OVA apresentaram um aumento significativo na migração de células inflamatórias tanto para a cavidade nasal como para pulmonar, confirmando a instalação do processo inflamatório. Os eosinófilos apresentaram o maior percentual de células a migrar para ambas as cavidades, demonstrando o seu papel fundamental na manutenção do processo inflamatório. Os macrófagos e linfócitos também estão aumentados na cavidade pulmonar, porém não foram observados na cavidade nasal. Esses dados estão em concordância com a literatura, onde foram demonstrados aumento de migração de eosinófilos em ambas as cavidades aéreas (LI et al., 2015, 2016; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

A migração majoritária de eosinófilos na rinite demonstra o processo inflamatório crônico nas vias aéreas superiores no grupo OVA. A coloração HE permite a observação da arquitetura geral da cavidade nasal, e, conseqüentemente, a migração leucocitária (GALVÃO et al., 2017). É possível a observação panorâmica da cavidade nasal em um aumento do microscópio ótico em 4 vezes (4X). Após

aproximação das objetivas (20X) evidencia-se a manutenção da arquitetura nasal, caracterizada por epitélio composto por células pseudoestratificadas ciliadas com células caliciformes, lâmina própria, septo nasal além de vários conjuntos de ácinos serosos, característicos da integridade normal da cavidade nasal. No grupo OVA, observou-se infiltrado inflamatório eosinofílico, além de necrose do epitélio respiratório. Observou-se, também, o aumento da migração celular perivascular subepitelial na cavidade nasal destes animais. Essa migração celular e inflamação com necrose do epitélio respiratório demonstra a degradação da cavidade nasal em um processo crônico inflamatório, característico da rinite. Estes parâmetros histopatológicos são característicos da inflamação tecidual na rinite experimental (LI et al., 2015, 2016; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

A coloração HE permite também a observação da arquitetura geral do tecido pulmonar, revelando o padrão típico do epitélio respiratório, o qual é formado por células pseudoestratificadas, ciliado com células caliciformes e em bronquíolos terminais. Nas vias aéreas inferiores observa-se o epitélio colunar baixo ou cúbico com células de clara e a parede alveolar com pneumócitos de estrutura preservada, como evidenciado no grupo Basal. No entanto, no grupo OVA, foi visualizado a presença de infiltrado inflamatório e edema multifocal peribronquiolo vascular, com presença de eosinófilos, linfócitos e macrófagos compondo o exsudato característico da inflamação pulmonar alérgica, confirmando o resultado encontrado na contagem total e diferencial desses animais.

Outra coloração histológica importante para observar alterações no tecido é o PAS que revela glicogênio e mucina intracelular, além da hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes. Nas lâminas com tecidos das vias aéreas coradas por PAS, a reação positiva ocorre quando observa-se em bonina a presença de glicogênio ou polissacarídeos neutros (contendo grupos 1,2 glicol) e mucina (glicoproteína, principal constituinte do muco) (GALVÃO et al., 2017). No grupo OVA observou-se hipertrofia e hiperplasia do epitélio bronquiolar e presença de tampão mucoso no interior de bronquíolos, diferente do grupo Basal, onde essas estruturas mantiveram-se sem alterações.

Já o corante histológico Tricrômico de Gomori (TG) tem a finalidade de identificar fibras musculares além da expansão da matriz extracelular, onde as fibras musculares se coram de vermelho e as fibras que compõem a matriz extracelular em verde. Uma das principais proteínas que compõem a matriz extracelular é o colágeno, o qual está intimamente relacionado ao processo de remodelamento

tecidual e fibrose, e este é o principal parâmetro de cronicidade do processo inflamatório da asma (HOLGATE et al., 2015; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; PELAIA et al., 2015). O remodelamento das vias aéreas inclui a perda da integridade epitelial, a fibrose subepitelial e a deposição de colágeno, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, aumento da produção de muco e glândulas submucosas e espessamento da parede das vias aéreas (LEE et al., 2017), sendo estes observados no grupo OVA.

Portanto, em resumo, observamos que houve migração significativa de células inflamatórias para o espaço peribronquiolar (HE), hiperprodução de muco pelas células caliciformes (PAS) e remodelamento tecidual (TG). Esses parâmetros histopatológicos são característicos da inflamação tecidual (LI et al., 2015, 2016; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016) e confirmam a instalação e manutenção da doença crônica nas vias aéreas, tanto superior como inferior.

A IgE é um anticorpo de fundamental importância no processo alérgico, sendo considerada um de seus biomarcadores (GALLI; TSAI, 2012; PALOMARES et al., 2017). Ela se liga aos receptores de alta afinidade (FcεRI) presentes nos mastócitos teciduais, basófilos e eosinófilos circulantes. Ao ligar-se, promove o processo de sensibilização do organismo, o que proporciona, em um contato posterior com o alérgeno, a degranulação dessas células e consequente efetividade do processo inflamatório (GALLI; TSAI, 2012; PALOMARES et al., 2017; WERNERSSON; PEJLER, 2014). A IgE é seletiva e específica ao alérgeno de forma que, ao ligar-se as porções proteicas do alérgeno específico, desencadeia todo o processo imunomodulador da resposta inflamatória alérgica (PALOMARES et al., 2017).

No modelo experimental da CARAS, implantado no Laboratório, observamos aumento na concentração de IgE OVA-específica no soro dos animais do grupo OVA, indicando o desenvolvimento do processo de sensibilização sistêmica e instalação efetiva da síndrome. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura (LI et al., 2015, 2016; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

A presença de IgE-OVA específica no modelo experimental demonstra o desenvolvimento da resposta imune tipo 2 (T_H2) com a produção das suas citocinas que mantêm a resposta imune ativa (FAHY, 2015a; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

A IL-4 é responsável por manter o perfil T_H2 polarizado e ativo e funciona como “*feedback*” positivo para a resposta imune tipo 2 (T_H2) (BAGNASCO et al., 2016; HELLER et al., 2008). A IL-4 se liga aos seus receptores presentes nos

linfócitos T_{H0} (*naive*) e induz a polarização para o perfil T_{H2} , de modo que, ao ser ativado o fator transcricional GATA-3, esta célula libera as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (BAGNASCO et al., 2016; FAHY, 2015b; HELLER et al., 2012).

A IL-13 também é essencial ao perfil T_{H2} , pois é responsável por atuar nas células caliciformes induzindo a produção de muco e promover a metaplasia das células epiteliais e, conseqüente, produção de muco (GOUR; WILLS-KARP, 2015; PRICE et al., 2010). Compartilhando os mesmos receptores, a IL-4 e a IL-13, ativam os linfócitos B e estes diferenciam-se em plasmócitos e produzem as IgE alérgeno-específicas (GOUR; WILLS-KARP, 2015; WILLS-KARP, 2004) além de promoverem a hiper-reatividade brônquica ativando macrófagos M2 que estão envolvidos no remodelamento tecidual, com conseqüente fibrose pela deposição de colágeno (GOUR; WILLS-KARP, 2015; LIANG et al., 2011).

Nosso trabalho apresentou um aumento significativo nas concentrações de IL-4 e IL-13 nos animais do grupo OVA. Esses resultados corroboram com a instalação e manutenção do processo alérgico T_{H2} . Foi possível notar um aumento mais expressivo da citocina IL-13, esse feito é em decorrência da produção desta citocina pelas ILC-2 (*Innate Lymphocyte cell*) (KABATA et al., 2015; NEILL et al., 2010; WOLTERINK et al., 2012). Ao analisarmos outros trabalhos da CARAS, observamos aumento considerável dessas duas citocinas demonstrando a efetivação do processo inflamatório alérgico crônico (LI et al., 2015, 2016; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

No tocante a polarização das respostas imunes tipos 1 (T_{H1}) e 2 (T_{H2}), nossos dados demonstraram que a razão IFN γ /IL-4 estava diminuída no grupo OVA, inferindo, portanto, a exacerbação do perfil T_{H2} , pois os níveis de IL-4 sobrepuseram aos níveis de IFN- γ . Esse dado é relevante na análise do processo imunológico presente, pois corrobora com os demais achados biológicos, confirmando a participação e predominância do perfil T_{H2} em relação aos outros perfis imunológicos, característico da asma e rinite alérgicas, demonstrando, por conseguinte, a instalação da CARAS nos animais OVA. Esse resultado corroborou com o encontrado na literatura, onde se faz o modelo da CARAS experimental (LI et al., 2015, 2016).

Dentre os mecanismos imunorreguladores das respostas imunológicas, a IL-10 produzida pelas células T regulatórias (Treg) suprime as demais células T $CD4^+$, incluindo a do perfil T_{H2} presente na CARAS. Entretanto, há outra forma de imunorregular a resposta T_{H2} que é a pela polarização do perfil T_{H1} em detrimento

ao perfil T_H2 , que produz as citocinas clássicas IFN- γ , IL-2 e TNF- β . O IFN- γ induz as células dendríticas (DCs) a apresentar antígenos e polarizar os linfócitos T $CD4^+$ para o fenótipo T_H1 (BOUSQUET et al., 2015; EIFAN et al., 2012; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; TANG et al., 2012). Esta citocina inibe o fator de transcrição GATA-3 em favor ao fator de transcrição Tbet responsável pela geração das células T_H1 (XU et al., 2016).

Nossos resultados demonstraram que o grupo OVA apresentou diminuição na produção de IFN- γ , indicando, portanto, a maior prevalência do perfil T_H2 e que este não está sendo imunorregulado negativamente pelo perfil T_H1 . Já a citocina IL-10 não teve seus valores alterados, o que permite inferir que, nestes animais, não está ocorrendo majoritariamente a imunorregulação. Pelo contrário, diante dos resultados obtidos, podemos inferir que o grupo OVA apresentou o perfil T_H2 instalado e sendo mantido pelos mecanismos imunomoduladores aqui apresentados, como aumento de IL-4 e de IL-13, bem como pelo aumento da IgE OVA-específica. Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura confirmando o perfil T_H2 instalado (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

O fator de transcrição NF- κ B ativado é considerado um regulador mestre da inflamação e processos imunes e tem sido amplamente envolvido na fisiopatologia de doenças alérgicas crônicas das vias aéreas (RICCIARDOLO et al., 2016; SCHULIGA; MICHAEL, 2015). A atividade do NF- κ B é rigorosamente controlada pelo inibidor proteico I κ B α , que é complexada com os dímeros p50 e p65 do NF- κ B para promover a retenção citoplasmática e baixa atividade basal transcricional (LI et al., 2014). Após a estimulação celular, o complexo de quinase I κ B fosforila I κ B α , causando sua ubiquitinação e degradação através da via do proteassoma 26S (LAM et al., 2008). A degradação de I κ B expõe a sequência de localização nuclear de NF- κ B (p65), a qual se transloca e acumula-se no núcleo, permitindo a sua ligação ao DNA e a estimulação da transcrição gênica. O NF- κ B desempenha um papel importante na maturação das células T_H , e a falha sistêmica para ativar NF- κ B resulta em uma menor resposta imunológica ao alérgeno (RICCIARDOLO et al., 2016; SCHULIGA; MICHAEL, 2015). No entanto, a ativação de NF- κ B também foi demonstrada especificamente no epitélio das vias aéreas em modelos animais de inflamação alérgica das vias aéreas (POYNTER; IRVIN; JANSSEN-HEININGER, 2002) e em pacientes com asma (ZHAO et al., 2001). O NF- κ B é fundamental para a expressão de mediadores inflamatórios e produção de citocinas (IL-5 e IL-13) em células T_H2 , além de aumentar os níveis de produção de IgE alérgeno específica e

promover metaplasia das mucosas (TULLY et al., 2013). Todos esses eventos induzidos pelo NF- κ B foram comprovados em modelos experimentais de alergia induzidos por OVA nas vias aéreas (LI et al., 2014) demonstrando que a ativação de NF- κ B no epitélio das vias aéreas se faz necessário para induzir o recrutamento de células inflamatórias em resposta ao desafio alergênico (POYNTER et al., 2004).

Os nossos resultados mostraram que os animais do grupo OVA apresentaram um aumento significativo da porção ativa p65 do NF- κ B, demonstrando, portanto, a atividade acentuada deste fator no protocolo implantado. Podemos correlacionar a expressão do NF- κ B com o aumento do influxo celular, principalmente eosinofílico, como também a hiperprodução de muco, além do aumento da produção de IgE. Esses eventos são essenciais no entendimento da fisiopatologia da CARAS, uma vez que, estando aumentada a fosforilação e ativação da p65 do NF- κ B, este torna-se um importante alvo molecular (WANG et al., 2016).

Diante do exposto neste trabalho, é possível confirmar que o protocolo da CARAS induzido por OVA foi implantado no LIMFA/UFPB, contemplando os parâmetros inflamatórios, alérgicos e crônicos característicos da patogênese desta síndrome, tornando possível o estudo de novas moléculas, candidatas a novos fármacos, a serem utilizadas no tratamento desta doença.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluímos que o modelo experimental da CARAS foi implantado no LIMFA/UFPB, tornando possível a análise dos parâmetros que caracterizam essa doença na clínica e, assim, estudar novas moléculas para compor o arsenal terapêutico desta síndrome. Os parâmetros inflamatórios, alérgicos e crônicos observados neste modelo experimental foram:

- ✓ Aumento dos sinais clínicos da rinite: fricção nasal e espirros;
- ✓ Aumento da reatividade da via aérea superior à histamina;
- ✓ Aumento da migração celular, principalmente eosinofílica para as cavidades nasal e pulmonar;
- ✓ A coloração HE demonstrou o infiltrado leucocitário tanto nos pulmões, na região perivascular e peribronquiolar, quanto na cavidade nasal, na região perivascular e subepital;
- ✓ A coloração de PAS evidenciou a hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes no epitélio bronquiolar e produção de muco;
- ✓ A coloração TG evidenciou o remodelamento da via aérea com a deposição de colágeno, confirmando o quadro alérgico crônico instalado;
- ✓ Aumento da produção de IgE OVA-específica sérica;
- ✓ Aumento das citocinas IL4 e IL13 no BALF;
- ✓ Diminuição da razão IFN γ /IL-4 no BALF;
- ✓ Aumento da ativação da porção p65 NF- κ B.

Esses dados inferem a implantação e aplicação funcional do modelo experimental de CARAS no LIMFA/UFPB.

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray shadow. The scroll is unrolled in the center, with the word 'REFERÊNCIAS' written in a black, elegant serif font. The left and right ends of the scroll are rolled up, and there are small circular details at the top and bottom corners of the scroll's frame.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGACHE, I.; AKDIS, C. A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. **Allergology International**, v. 65, n. 3, p. 243–252, jul. 2016.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9–14, 2012.
- AMIN, K. The Role of the T lymphocytes and Remodeling in Asthma. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1475–1482, 24 ago. 2016.
- AMIN, K. A. M. Allergic Respiratory Inflammation and Remodeling. **Turkish Thoracic Journal/Türk Toraks Dergisi**, v. 16, n. 3, p. 133–140, 6 jul. 2015.
- ASBAI. **ASBAI - Associação Brasileira de Alergia e Imunologia**. Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/secao.asp?s=81&id=940>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- AUN, M. V. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. **Journal of asthma and allergy**, v. 10, p. 293–301, 2017.
- BAGNASCO, D. et al. A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 170, n. 2, p. 122–131, 2016.
- BARLOW, J. L. et al. Innate IL-13–producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 1, p. 191–198.e4, jan. 2012.
- BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 15 mar. 2008.
- BARNES, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 13, p. 1541–1558, 1 jul. 2017.
- BARRETT, N. A. et al. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 2, p. 1119–28, 15 jan. 2009.
- BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodioides* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 7, p. 1152–1160, jul. 2006.
- BLUME, C.; DAVIES, D. E. In vitro and ex vivo models of human asthma. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 394–400, jun. 2013.
- BONAMICHI-SANTOS, R. et al. Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us? **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- BOULET, L.-P. Airway remodeling in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 56–62, jan. 2018.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008*. **Allergy**, v. 63, p. 8–160, abr. 2008.
- BOUSQUET, J. et al. MACVIA-ARIA Sentinel Network for allergic rhinitis (MASK-rhinitis): the new generation guideline implementation. **Allergy**, v. 70, n. 11, p. 1372–1392, nov. 2015.
- BRIGHTLING, C. E. et al. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. **Thorax**, v. 58, n. 6, p. 528–32, jun. 2003.
- BROŽEK, J. L. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 4, p. 950–958, out. 2017.
- CANNING, B. J.; CHOU, Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 702–20, out. 2008.

- CASALE, T. B. Biologics and biomarkers for asthma, urticaria, and nasal polyposis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 5, p. 1411–1421, 2017.
- CHAPMAN, D. G. et al. Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next? **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 12, p. 2055–64, dez. 2014.
- CHEN, Z. et al. Immunosuppressive effect of sinomenine in an allergic rhinitis mouse model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 2405–2410, 2017.
- CORDEIRO, M. B. **Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetrahidroisoquinolínicos inéditos**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2012.
- DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil Cytokines, Chemokines, and Growth Factors: Emerging Roles in Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 570, 10 nov. 2014.
- DJUKANOVIĆ, R. et al. Mucosal Inflammation in Asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 142, n. 2, p. 434–457, ago. 1990.
- EIFAN, A. O. et al. Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 6, p. 891–900, jun. 2012.
- EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, n. 9, p. 1139–1151, set. 2016.
- EL-SHAZLY, A. et al. Tyrosine kinase inhibition is an important factor for gene expression of CRTH2 in human eosinophils and lymphocytes: A novel mechanism for explaining eosinophils recruitment by the neuro-immune axis in allergic rhinitis. **International Immunopharmacology**, v. 45, p. 180–186, 1 abr. 2017.
- ELTBOLI, O. et al. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 20, n. 4, p. 667–70, maio 2015.
- FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57–65, 2015a.
- FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57–65, jan. 2015b.
- FLOOD-PAGE, P. et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 1029–1036, out. 2003.
- FORNHEM, C. et al. Allergen-induced late-phase airways obstruction in the pig: mediator release and eosinophil recruitment. **Eur Respir J**, v. 8, n. 8, p. 1100–1109, 1995.
- GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693–704, 2012.
- GALVÃO, J. G. F. M. et al. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1117–1130, 2017.
- GAVETT, S. H. et al. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1527–36, nov. 1995.
- GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: Role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 7, n. 1, p. 34–51, 2016a.
- GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 7, n. 1, p. 34–51, jan. 2016b.
- GINA. Global Strategy For Asthma Management and Prevention. **Global Initiative for Asthma**, p. <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strat>, 2017.
- GÓMEZ, E. et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite

- immunotherapy response. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 45, n. 10, p. 1542–53, out. 2015.
- GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 205–217, mar. 2008.
- GOUR, N.; WILLS-KARP, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 68–78, set. 2015.
- GREEN, R. H. et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 875–9, out. 2002.
- GUIBAS, G. V et al. Relationship of Allergy with Asthma: There Are More Than the Allergy "Eggs" in the Asthma "Basket". **Frontiers in pediatrics**, v. 5, p. 92, 2017.
- GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 27 jul. 2012.
- HAENUKI, Y. et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 184–194.e11, jul. 2012.
- HANKIN, C. S.; COX, L. Allergy immunotherapy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 14, n. 4, p. 363–370, ago. 2014.
- HELLER, N. M. et al. Type I IL-4Rs selectively activate IRS-2 to induce target gene expression in macrophages. **Science signaling**, v. 1, n. 51, p. ra17, 23 dez. 2008.
- HELLER, N. M. et al. IL-4 Engagement of the Type I IL-4 Receptor Complex Enhances Mouse Eosinophil Migration to Eotaxin-1 In Vitro. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39673, 28 jun. 2012.
- HELLINGS, P. W. et al. Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 72, n. 11, p. 1657–1665, nov. 2017.
- HENS, G. et al. Original article: Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: “united airway disease” beyond the scope of allergy. **Allergy**, v. 63, n. 3, p. 261–267, 5 dez. 2007.
- HIRAI, H. et al. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 2, p. 255–61, 15 jan. 2001.
- HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15025, 10 set. 2015.
- HOWARTH, P. H. Allergic rhinitis: not purely a histamine-related disease. **Allergy**, v. 55, n. s64, p. 7–16, 1 dez. 2000.
- IBIAPINA, C. DA C. et al. Rhinitis, sinusitis and asthma: hard to dissociate? **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 32, n. 4, p. 357–66, 2006.
- ISHIDA, W. et al. Adjuvants determine the contribution of basophils to antigen sensitization in vivo. **Immunology Letters**, v. 136, n. 1, p. 49–54, 30 abr. 2011.
- JATAKANON A, LIM S, B. P. Changes in Sputum Eosinophils Predict Loss of Asthma Control. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 64–72, jan. 2000.
- JOHNSON, J. R. et al. Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 3, p. 378–385, 1 fev. 2004.
- KABATA, H. et al. Group 2 innate lymphoid cells and asthma. **Allergology International**, v. 64, n. 3, p. 227–234, 2015.
- KALINER, M. A. Classification of Nonallergic Rhinitis Syndromes With a Focus on Vasomotor Rhinitis, Proposed to be Known henceforth as Nonallergic Rhinopathy.

- The World Allergy Organization journal**, v. 2, n. 6, p. 98–101, 15 jun. 2009.
- KAY, A. B. The Role of T Lymphocytes in Asthma. In: **Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach**. Basel: KARGER, 2006. v. 91p. 59–75.
- KAY, A. B. The early history of the eosinophil. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 3, p. 575–582, 1 mar. 2015.
- KAY, A. B.; PHIPPS, S.; ROBINSON, D. S. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 9, p. 477–482, set. 2004.
- KIM, C. H. et al. Co-Administration of Vaccination with DNA Encoding T Cell Epitope on the Der p and BCG Inhibited Airway Remodeling in a Murine Model of Chronic Asthma. **Journal of Asthma**, v. 43, n. 5, p. 345–353, 2 jan. 2006.
- KIM, S. H.; HONG, J. H.; LEE, Y. C. Chelidonine, a principal isoquinoline alkaloid of *Chelidonium majus*, attenuates eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-4 and eotaxin-2 expression in asthmatic mice. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 6, p. 1168–1177, 2015.
- KIRSCHVINK, N. et al. Functional, inflammatory and morphological characterisation of a cat model of allergic airway inflammation. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 174, n. 3, p. 541–53, nov. 2007.
- KIRSCHVINK, N.; REINHOLD, P. Use of alternative animals as asthma models. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 470–84, jun. 2008.
- KRIEGER, S. M. et al. Assessment of the respiratory sensitization potential of proteins using an enhanced mouse intranasal test (MINT). **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 165–76, set. 2013.
- KUMAR, R. K. et al. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 32, n. 7, p. 1104–11, jul. 2002.
- KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 485–94, jun. 2008.
- KUYAMA, S. et al. Effect of 5-aminosalicylate on allergic rhinitis model in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 6, p. 713–716, 2010a.
- KUYAMA, S. et al. Effect of 5-aminosalicylate on allergic rhinitis model in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 6, p. 713–716, 2010b.
- LAM, D. et al. Airway house dust extract exposures modify allergen-induced airway hypersensitivity responses by TLR4-dependent and independent pathways. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 4, p. 2925–32, 15 ago. 2008.
- LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 23–29, fev. 2009.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.
- LEDFORD, D. Inadequate diagnosis of nonallergic rhinitis: assessing the damage. **Allergy and asthma proceedings**, v. 24, n. 3, p. 155–62, 2003.
- LEE, I. S. et al. Applicability of endoscopic submucosal dissection for undifferentiated early gastric cancer: Mixed histology of poorly differentiated adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma is a worse predictive factor of nodal metastasis. **Surgical Oncology**, v. 26, n. 1, p. 8–12, mar. 2017.
- LI, H. et al. Intranasal administration of CpG oligodeoxynucleotides reduces lower airway inflammation in a murine model of combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 390–398, 2015.
- LI, H. et al. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a

mechanism that possibly involves in TSLP airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome. *v. 2148*, n. August, 2016.

LI, X. et al. Ovalbumin-induced experimental allergic asthma is Toll-like receptor 2 dependent. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 35, n. 2, p. 15–20, 1 mar. 2014.

LIANG, H.-E. et al. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 1, p. 58–66, 4 dez. 2011.

LICONA-LIMÓN, P. et al. Corrigendum: TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nature Immunology**, v. 15, n. 1, p. 109–109, 18 dez. 2013.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 12, p. 838–48, dez. 2010.

MELTZER, E. O. et al. Burden of allergic rhinitis: Allergies in America, Latin America, and Asia-Pacific adult surveys. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 33, n. 5, p. 113–141, 1 set. 2012.

MELUM, G. R. et al. A thymic stromal lymphopoietin–responsive dendritic cell subset mediates allergic responses in the upper airway mucosa. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 613–621.e7, set. 2014.

MESQUITA-SANTOS, F. P. et al. Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 176, n. 3, p. 1326–30, 1 fev. 2006.

MULLARKEY, M. F. Eosinophilic nonallergic rhinitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 82, n. 5 Pt 2, p. 941–9, 1 nov. 1988.

MURARO, A. et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis—PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1347–1358, maio 2016.

MUTALITHAS, K. et al. CRTH2 expression on T cells in asthma. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 161, n. 1, p. no-no, 1 jun. 2010.

NASR, W. et al. The Role of the Level of Interleukin-33 in the Therapeutic Outcomes of Immunotherapy in Patients with Allergic Rhinitis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, 28 ago. 2017.

NEILL, D. R. et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367–1370, 3 abr. 2010.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models and Mechanisms**, v. 1, n. 4–5, p. 213–220, 1 nov. 2008.

OHRUI, T. et al. Vascular permeability and airway narrowing during late asthmatic response in dogs treated with Metopirone. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 89, n. 5, p. 933–43, maio 1992.

OMS. **OMS | Asma.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/es/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

PACHECO DE OLIVEIRA, M. T. et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 400–412, jul. 2015.

PALOMARES, Ó. et al. divergent: How IgE axis contributes to the continuum of allergic asthma and anti-IgE therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–14, 2017.

PELAIA, G. et al. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 879783, 23 mar. 2015.

- PETERS, M. et al. Influence of an Allergen-Specific Th17 Response on Remodeling of the Airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 3, p. 350–358, mar. 2016.
- POSSA, S. S. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 46, 2013.
- POYNTER, M. E. et al. NF-kappa B activation in airways modulates allergic inflammation but not hyperresponsiveness. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 11, p. 7003–9, 1 dez. 2004.
- POYNTER, M. E.; IRVIN, C. G.; JANSSEN-HEININGER, Y. M. W. Rapid activation of nuclear factor-kappaB in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. **The American journal of pathology**, v. 160, n. 4, p. 1325–34, abr. 2002.
- PRICE, A. E. et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p. 11489–94, 22 jun. 2010.
- REN, M. et al. *Mahuang Fuzi Xixin* Decoction Attenuates Th1 and Th2 Responses in the Treatment of Ovalbumin-Induced Allergic Inflammation in a Rat Model of Allergic Rhinitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- RICCIARDOLO, F. L. M. et al. Bradykinin B2 receptor expression in the bronchial mucosa of allergic asthmatics: the role of NF-kB. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, n. 3, p. 428–438, 1 mar. 2016.
- ROBERTS, G. et al. Paediatric rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 68, n. 9, p. n/a-n/a, ago. 2013.
- ROSENBERG, H. F.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 6, p. 1303–1310, jun. 2007.
- RUBINI, N. D. P. M. et al. Guia prático sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 1, p. 7–22, 2017.
- SAGAR, S.; AKBARSHAH, H.; ULLER, L. Translational value of animal models of asthma: Challenges and promises. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 272–277, 15 jul. 2015.
- SAKANO, E. et al. IV Consenso Brasileiro sobre Rinites 2017. **Documento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia, Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial e Sociedade Brasileira de Pediatria.**, p. 1–43, 2017.
- SANO, K. et al. Ovalbumin (OVA) and *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli Cooperatively Polarize Anti-OVA T-helper (Th) Cells toward a Th1-Dominant Phenotype and Ameliorate Murine Tracheal Eosinophilia. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1260–1267, 14 jun. 1999.
- SCHULIGA, M.; MICHAEL. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 1266–1283, 26 jun. 2015.
- SHAKOORY, B. et al. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in Eosinophil Biology. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 24, n. 5, p. 271–281, maio 2004.
- SHAPIRO, S. D. The use of transgenic mice for modeling airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 699–701, out. 2008.
- SIDDIQUI, S. et al. Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 122, n. 2, p. 335–41, 341–3, ago. 2008.
- SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1139–1150.e4, dez. 2011.

- SIVA, R. et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 5, p. 906–913, 1 maio 2007.
- SMIT, J. J.; LUKACS, N. W. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1–3, p. 277–288, 8 mar. 2006.
- STOCK, P. et al. CD8+ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 7, p. 1817–1827, jul. 2004.
- SUN, D. et al. Matrine suppresses airway inflammation by downregulating SOCS3 expression via inhibition of NF- κ B signaling in airway epithelial cells and asthmatic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 1, p. 83–90, 2016.
- SZELENYI, I. Animal models of bronchial asthma. **Inflammation Research**, v. 49, n. 12, p. 639–654, 1 dez. 2000.
- TAKAHASHI, G. et al. Effect of the potent and selective DP1 receptor antagonist, asapiprant (S-555739), in animal models of allergic rhinitis and allergic asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, p. 15–23, 15 out. 2015.
- TAKAZONO, T.; SHEPPARD, D. C. *Aspergillus* in chronic lung disease: Modeling what goes on in the airways. **Medical Mycology**, v. 55, n. 1, p. 39–47, 1 jan. 2017.
- TANG, Y. et al. Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 6, p. 1611–1620.e4, jun. 2012.
- TOGIAS, A. Unique mechanistic features of allergic rhinitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 105, n. 6 Pt 2, p. S599-604, jun. 2000.
- TRAN, N. P.; VICKERY, J.; BLAISS, M. S. Management of rhinitis: allergic and non-allergic. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 3, n. 3, p. 148–56, jul. 2011.
- TULLY, J. E. et al. Epithelial NF- κ B orchestrates house dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, and fibrotic remodeling. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 12, p. 5811–21, 15 dez. 2013.
- UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. The regulation of allergy and asthma. **Immunological Reviews**, v. 212, n. 1, p. 238–255, ago. 2006.
- VAN DYKEN, S. J. et al. Chitin Activates Parallel Immune Modules that Direct Distinct Inflammatory Responses via Innate Lymphoid Type 2 and $\gamma\delta$ T Cells. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 414–424, mar. 2014.
- VAN DER WORP, H. B. et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? **PLoS Medicine**, v. 7, n. 3, p. e1000245, 30 mar. 2010.
- VAN RIJT, L. S. et al. Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 7, p. 3372–8, out. 2003.
- VUURMAN, E. F. P. M. et al. Allergic rhinitis is a risk factor for traffic safety. **Allergy**, v. 69, n. 7, p. 906–912, jul. 2014.
- WAGERS, S. et al. The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2019–2027, jun. 2004.
- WANG, X. et al. Potent ameliorating effect of Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) antagonist YC-1 on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 343–350, 2016.
- WARDLAW, A. J. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 104, n. 5, p. 917–26, 1 nov. 1999.
- WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: Armed for battle.

- Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478–494, 2014.
- WHEATLEY, L. M.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 456–463, 29 jan. 2015.
- WHO. **WHO | Asthma (World Health Organization)**. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- WILLS-KARP, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 202, n. 1, p. 175–190, 1 dez. 2004.
- WOLTERINK, R. G. J. K. et al. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 5, p. 1106–1116, maio 2012.
- WOLTMANN, G. et al. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3146–52, 15 maio 2000.
- WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 5, p. 271–282, 17 maio 2015.
- XU, X. et al. Expression of Th1- Th2- and Th17-associated cytokines in laryngeal carcinoma. **Oncology letters**, v. 12, n. 3, p. 1941–1948, set. 2016.
- XU, Y.; ZHANG, J.; WANG, J. The efficacy and safety of selective H1-antihistamine versus leukotriene receptor antagonist for seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112815, 2014.
- YOSHIMOTO, T. et al. Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide–MHC class II complexes to CD4+ T cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 7, p. 706–712, 24 jul. 2009.
- YOUSEFI, S.; SIMON, D.; SIMON, H.-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 736–739, dez. 2012.
- ZHANG, Y. L. et al. Role of Interleukin-17A on the chemotactic responses to ccl7 in a murine allergic rhinitis model. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2017.
- ZHANG, Z. et al. Dietary fiber intake regulates intestinal microflora and inhibits ovalbumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.
- ZHAO, S. et al. Activation of NF-kappa B in bronchial epithelial cells from children with asthma. **Chinese medical journal**, v. 114, n. 9, p. 909–11, set. 2001.
- ZOSKY, G. R.; SLY, P. D. Animal models of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, n. 7, p. 973–988, jul. 2007.
- ZUBERBIER, T. et al. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA² LEN review. **Allergy**, v. 69, n. 10, p. 1275–1279, out. 2014.

ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do alcaloide sintético tetrahidroisoquinolínico MHTP em modelo experimental de CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinada)”, protocolo nº 165/2015 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Marcia Regina Piuvezam** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2015 a 2019
Espécie/linhagem	Camundongos BALB/C (<i>Mus musculus</i>) Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Número de animais	234 camundongos 47 ratos
Idade/Peso	Camundongos 6 a 8 semanas/ 20 a 25 g Ratos 6 a 8 semanas/ 150 a 170 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Isiania Giselia Albuquerque Gonçalves
 Profa. Dra. Isiania Giselia Albuquerque Gonçalves
 Coordenadora da CEUA-UFPB
 Prof. Dr. Isiania G.A. Gonçalves
 Coordenadora CEUA-UFPB
 SIAPE 3366301