

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Martielle Andressa Silva Medeiros

**Estudo da
refratariedade a
glicocorticoides em
modelo murino de
asma**

Rio de Janeiro

2021

MARTIELLE ANDRESSA SILVA MEDEIROS

**ESTUDO DA REFRTARIEDADE A GLICOCORTICOIDES EM
MODELO MURINO DE ASMA**

Projeto de Pesquisa apresentado ao IFRJ/campus Realengo, como cumprimento parcial das exigências para conclusão do curso de Bacharel em Farmácia.

Orientadoras: Prof.^a Dr.^a Thais Emanuelle Tavares Pompeu de Lima e Dr.^a Amanda da Costa Cotias Santana

Rio de Janeiro
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

M488	Medeiros, Martielle Andressa Silva. Estudo da refratariedade a glicocorticoides em modelo murino de asma. / Martielle Andressa Silva Medeiros, 2021. 59f. ; il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2021. Orientadoras: Thais Emanuelle Tavares Pompeu de Lima ; Amanda da Costa Cotias Santana. 1. Asma grave. 2. Refratariedade. 3. Glicocorticoides. 4. Resistência a esteróides. 5. Modelos animais. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Lima, Thais Emanuelle Tavares Pompeu de. III. Santana, Amanda da Costa Cotias. IV. Título.
COBIB/CReal	CDU 615

Ficha catalográfica elaborada por Alane Elias Souza
Bibliotecária - CRB 7 n° 6321

MARTIELLE ANDRESSA SILVA MEDEIROS

ESTUDO DA REFRATARIEDADE A GLICOCORTICOIDES EM MODELO
MURINO DE ASMA

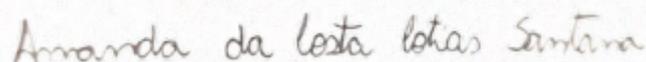
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Federal do
Rio de Janeiro como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Data da aprovação: 17/02/2022

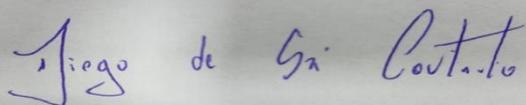
BANCA EXAMINADORA



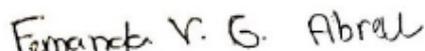
Prof.^a Dr.^a Thais Emanuelle Tavares Pompeu de Lima – (Orientadora interna)
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)



Dr.^a Amanda da Costa Cotias Santana – (Orientadora externa)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)



Dr. Diego de Sá Coutinho – (Membro externo)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)



Dr.^a Fernanda Verdini Guimarães Abreu – (Membro externo)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai Celestial e grande incentivador, agradeço por me fornecer durante todos esses anos de graduação forças e coragem para vencer os obstáculos que apareciam a cada período letivo. Gratidão por alimentar minha fé, pois foi através dela que eu não me permiti desacreditar no meu potencial. Sou eternamente grata pelas oportunidades concedidas, a capacitação obtida em cada uma delas e pela permissão a chegar ao final desta etapa.

Agradeço a minha amada mãe, Maria da Conceição, a quem dedico este trabalho, pela dedicação e luta em tornar este sonho possível. Obrigada por sempre me impulsionar a voar cada vez mais alto e me oferecer apoio constante em minhas decisões. Não tive uma amiga melhor do que a senhora nessa trajetória. Sempre assumindo as minhas batalhas como suas e muito orgulhosa de cada conquista minha. Você é a minha maior referência!

Ao meu pai, Aguinaldo Medeiros (em memória) por ter sido a base para a minha formação moral e acadêmica. Certamente está comemorando esse momento de realização em um lugar melhor.

O meu muito obrigada a minha irmã, Natália Medeiros, amiga de sempre e a quem confidencio meus momentos de alegria e angústia. A você sempre serei grata pela sua torcida, por trazer mais leveza e amor para os dias difíceis, por acreditar em mim e sempre reforçar isso. Meu reconhecimento por ter dado muito de si mesmo; se meus manuscritos do curso falassem eles seriam testemunhas suas.

A toda minha família pela vibração e torcida, em especial minha tia madrinha Elenilza Silva e minha prima Elisangela de Paula. Obrigada por estarem sempre disponíveis e dispostas a me ajudar.

Às minhas queridas orientadoras, Amanda Cotias e Thaís Pompeu, por terem antes de tudo me aceito como orientanda. Agradeço a confiança depositada e a disponibilidade em contribuir construtivamente para a melhoria deste trabalho mesmo diante de tantos compromissos. Sou imensamente grata por todos os grandes ensinamentos que obtive através dessa parceria, pela paciência, carinho e apoio ao longo dessa jornada. As duas são fontes de inspiração para mim!

As minhas amigas do IFRJ e colegas de profissão, em especial Thaís Alves e Victória Mendes que estão comigo desde o primeiro período, e todas as demais que eu tive o imenso prazer em conhecer ao longo dos semestres seguintes como

Camila Valério, Fernanda Ocampo e Thaís Barbosa. Obrigada pela companhia diária, pelas horas de estudo, seções de desabafo e pelas conversas paralelas. Essa panelinha que eu tanto me orgulho! Vocês conseguiram tornar tudo mais fácil e leve, sem dúvidas essa caminhada não seria a mesma sem vocês.

Agradeço as amigas que a Iniciação Científica me forneceu: Nathália Beserra, Marina Fernandes e Camila Procópio. Obrigada por serem além de colegas de laboratório, grandes amigas. Obrigada pela ajuda sem igual no laboratório e por todos os momentos compartilhados.

A todos os amigos que se acostumaram com a minha ausência, mas estavam torcendo por mim. Com certeza fizeram dos meus dias livres os melhores possíveis.

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, por ter me acolhido em seu laboratório e ter me concedido a oportunidade de fazer parte do projeto de onde nasceu meu trabalho de conclusão de curso.

Aos membros da Banca, Dr. Diego de Sá Coutinho e Dr.^a Fernanda Verdini Guimarães Abreu, por aceitar meu convite e pelas correções e sugestões realizadas.

A esta Faculdade, em especial os docentes do curso de Farmácia, deixo aqui registrada minha eterna gratidão por seus ensinamentos valiosos, orientações e incentivo. Obrigada por me guiarem no caminho do conhecimento.

A todos os integrantes das equipes de Farmácia Hospitalar do Hospital da Força Aérea do Galeão (HFAG) e do Hospital Municipal da Piedade (HMP), do setor de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Maternidade Alexander Fleming (HMAF), Laboratório de Controle Bromatológico e Microscópico (LabCBroM), Laboratório de Inflamação (LABINFLA) e Farmácia de Manipulação Guadalupe, agradeço calorosamente a receptividade por cada lugar que passei e por terem dividido seus brilhantes conhecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio financeiro concedido.

E a todos aqueles que embora não citados nominalmente acima, estão envolvidos, direta ou indiretamente, na construção desse sonho.

“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte
duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”

O pequeno príncipe
Antoine de Saint-Exupéry

MEDEIROS, Martielle Andressa Silva. Estudo da refratariedade a glicocorticoides em modelo murino de asma. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

RESUMO

A asma é definida como uma doença crônica do sistema respiratório, caracterizada pela presença de graus variáveis de inflamação crônica e remodelamento pulmonar, tratada preferencialmente com uso regular de glicocorticoides inalatórios. Dentre as classificações da doença, a asma grave é aquela em que os pacientes apresentam uma resposta reduzida ou não respondem ao tratamento medicamentoso, e apesar de compreender uma menor parcela de pacientes asmáticos (5-10%) é a que oferece maior risco de morte em decorrência da doença. Sabendo que uma parcela de pacientes asmáticos graves é refratária a glicocorticoides e que a refratariedade é uma importante barreira no tratamento da asma, estudos direcionados a condição de insensibilidade a glicocorticoides são necessários. Entretanto, é essencial que se desenvolvam modelos animais que mimetizem as características comuns da asma humana, para que seja possível estudar os mecanismos relacionados a fisiopatologia da doença, além de elucidar os mecanismos envolvidos na refratariedade a glicocorticoides. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento da refratariedade a glicocorticoide em modelo de asma crônica. Para indução dessa resposta inflamatória alérgica, camundongos A/J machos foram sensibilizados duas vezes com ovoalbumina (OVA) (50 µg/5mg de hidróxido de alumínio) por via subcutânea, com uma semana de intervalo entre as sensibilizações. Após sete dias da última sensibilização, os animais foram desafiados com o mesmo alérgeno por instilação nasal (50 µg/25µL), 1 vez por semana, durante 4 semanas (protocolo de asma sensível a glicocorticoides) ou 9 semanas (protocolo de asma refratária a glicocorticoides) seguidas. O tratamento inalatório com budesonida (7,5 mg/mL) ocorreu a partir da terceira semana de desafio, 1 hora antes de cada exposição a OVA, enquanto as análises foram realizadas 24 h após a última provocação antigênica. Foram avaliados os seguintes parâmetros: hiper-responsividade das vias aéreas, produção de muco, remodelamento tecidual, quantificação dos níveis das citocinas IL-4, IL-13, das quimiocinas eotaxina-1 e eotaxina-2, atividade da enzima catalase (CAT) e produção de malondialdeído (MDA). Resultados: Os camundongos desafiados com OVA apresentaram respostas de hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas comparado com animais desafiados com salina, nos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias e MDA, além de apresentarem redução da atividade de catalase, em ambos os protocolos avaliados. Os animais submetidos à condição de 4 provocações com alérgeno demonstraram sensibilidade ao tratamento com budesonida. Em contrapartida, os animais que passaram por um maior número de desafios antigênicos (9 semanas) tornaram-se resistentes ao tratamento com o glicocorticoide. Em conjunto, estes resultados sugerem que os animais A/J desenvolvem diversas características da fisiopatologia da asma, e conforme vão sendo desafiados se tornam refratários ao tratamento com o glicocorticoide. Este modelo experimental pode ser uma ferramenta importante para estudar os mecanismos relacionados à resistência a glicocorticoide, além de poder ser utilizado para a triagem de novos fármacos com potencial efeito anti-inflamatório para o tratamento da asma grave refratária a glicocorticoides.

Palavras-chave: Asma grave. Refratariedade. Glicocorticoides. Resistência a esteróides. Modelos animais.

MEDEIROS, Martielle Andressa Silva. Study of glucocorticoid refractoriness in a murine model of asthma. 59f. Completion of course work. Graduation in Pharmacy, Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

ABSTRACT

Asthma is described as a chronic disease of the respiratory system, characterized by the presence of varying degrees of chronic inflammation and lung remodeling, preferably treated with regular use of inhaled glucocorticoids. Among the disease classifications, severe asthma is one in which patients have a reduced response or do not respond to glucocorticoid, and despite comprising a smaller portion of asthmatic patients (5-10%), it is the one with the highest risk of death. Knowing that a portion of severe asthmatic patients is refractory to glucocorticoids and that refractoriness is an important barrier asthma treatment, studies directed to glucocorticoid insensitivity condition are necessary. However, it is essential to develop animal models that mimic the common features of human asthma, so that is possible to study the mechanisms related to the pathophysiology of the disease, in addition to elucidating the mechanisms involved in glucocorticoid refractoriness. Thus, the objective of this work was to study the development of glucocorticoid refractoriness in a model of chronic asthma. To induce this allergic response, A/J mice were sensitized twice with ovalbumin (OVA) (50 µg/5mg aluminum hydroxide) subcutaneously, with a one-week interval between sensitizations. Seven days after the last sensitization, the animals were challenged with the same allergen by nasal instillation (50 µg/25µL), once a week, for 4 weeks (glucocorticoid-sensitive asthma protocol) or 9 weeks (glucocorticoid-refractory asthma protocol) followed. Inhaled treatment with budesonide (7.5 mg/mL) occurred from the third week of challenge, 1 hour before each OVA exposure, while the analyzes were performed 24 h after the last antigenic challenge. The following parameters were evaluated: airway hyperresponsiveness, mucus production, tissue remodeling, quantification of cytokines (IL-4, IL-13) and chemokines (eotaxin-1 and eotaxin-2) levels, the activity of the catalase enzyme (CAT) and malondialdehyde (MDA) production. Results: Mice challenged with OVA showed hyperreactivity and airway remodeling responses compared to animals challenged with saline, levels of inflammatory cytokines and chemokines and MDA, in addition to showing reduced catalase activity, in both protocols evaluated. Animals subjected to 4 allergen challenge condition demonstrated sensitivity to budesonide treatment. In contrast, animals that underwent a greater number of antigenic challenges (9 weeks) became resistant to glucocorticoid treatment. Taken together, these results suggest that A/J mice develop several features of asthma pathophysiology, and as they are challenged, they become refractory to glucocorticoid treatment. This experimental model may be an important tool to study glucocorticoid resistance mechanisms, in addition to being able to be used to screen new drugs with potential anti-inflammatory effects for the treatment of glucocorticoid-refractory severe asthma.

Keywords: Severe asthma. Refractoriness. Glucocorticoids. Steroid resistance. Animal models.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
AHR	Hiper-responsividade das vias aéreas
AKT	Proteína Quinase B
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
AP-1	Proteína Ativadora 1
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAT	Catalase
CBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc
CD	Célula Dendrítica
CEUA	Comissão de Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“ <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ” (teste imunoenzimático)
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
FTs	Fatores de transcrição
GC	Glicocorticoide
GINA	Iniciativa Global para a Asma
GPx	Glutathiona Peroxidase
GR	Receptor de Glicocorticoide
GR-α	Isoforma ativa do Receptor de Glicocorticoide
GR-β	Isoforma dominante negativa do Receptor de Glicocorticoide
GRD	Carga Global de Doenças
GRE	Elementos Responsivos aos Glicocorticoides
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAT	Histona acetil transferase
HDAC-2	Histona Desacetilase 2

hGR	Receptor de glicocorticoide humano
ICS	Corticosteróides Inalatórios
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
IgE	Imunoglobulina E
IL-()	Interleucina ()
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LABA	β 2-agonistas de longa duração
LABINFLA	Laboratório de Inflamação
LAMA	Antagonistas muscarínicos de longa ação
LBD	Domínio de ligação ao ligante
MBP	Proteína básica principal
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMPs	Metaloproteases de matriz
NaCl	Cloreto de sódio, salina
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO \cdot	Óxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritroide 2
NR3C1	Gene do receptor de glicocorticoides
O $_2^{\cdot-}$	Superóxido
ONOO \cdot	Peroxinitrito
OVA	Ovoalbumina
p38MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio p38
pAKT	Proteína quinase B fosforilada
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato salina
pCAF	Fator ativador p300/CBP
PI3K	Fosfoinosítideo-3-quinase
PTM	Modificações pós-tradução

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RONS	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SABA	β 2-agonistas de curta ação
SOD	Superóxido Dismutase
SRC-2	Coativador do receptor de glicocorticoides-2
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG	Tricômico de Gomori
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TIMPs	Inibidores de tecido de metaloproteases de matriz
Tyr	Tirosina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
α	Alfa
κ	Kappa
δ	Delta
g	Gramma
°C	Graus Celsius
h	Hora
μg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
kg	Quilograma
mM	Milimolar
μm	Micrômetro
min	Minuto
rpm	Rotações por minuto
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
nmol	Nanomol
\pm	Mais ou menos
\leq	Menor ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ASMA	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA	17
1.3 FISIOPATOLOGIA DA ASMA	19
1.3.1 Inflamação das vias aéreas	19
1.3.2 Remodelamento das vias aéreas	22
1.4 TERAPIA DA ASMA	23
1.4.1 Glicocorticoides	25
1.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS GLICOCORTICOIDES	28
2 DESENVOLVIMENTO	33
2.1 OBJETIVOS	33
2.1.1 Objetivo Geral	33
2.1.2 Objetivos Específicos	33
2.2 METODOLOGIA	34
2.2.1 Animais	34
2.2.2 Protocolo de asma sensível e refratária a glicocorticoides	34
2.2.2.1 Sensibilização e desafio antigênico	34
2.2.2.2 Tratamento com budesonida	35
2.2.3 Avaliação da função pulmonar	35
2.2.3.1 Avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina por pletismografia invasiva	35
2.2.4 Análises histológicas	36
2.2.4.1 Confecção dos cortes pulmonares para avaliação histopatológica	36
2.2.4.2 Quantificação da produção de muco por morfometria digital	37
2.2.4.3 Quantificação da fibrose subepitelial por morfometria digital	37
2.2.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas pulmonares	38
2.2.6 Avaliação do quadro de desequilíbrio redox	39
2.2.6.1 Preparo das amostras	39
2.2.6.2 Avaliação da atividade da enzima catalase	39
2.2.6.3 Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	39

2.2.7 Análise estatística	40
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
2.3.1 Efeito do tratamento com budesonida sobre a hiper-responsividade das vias aéreas em modelos de asma grave experimental	41
2.3.2 Efeito do tratamento com budesonida sobre a produção de muco nas vias aéreas em modelos de asma grave experimental	43
2.3.3 Efeito do tratamento com budesonida sobre fibrose peribronquiolar em modelos de asma grave experimental.....	45
2.3.4 Efeito do tratamento com budesonida sobre os níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no homogenato pulmonar em modelos de asma grave experimental.....	47
2.3.5 Efeito do tratamento com budesonida sobre a atividade da enzima CAT e dos níveis de MDA em modelos de asma grave experimental	49
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASMA

Segundo definição publicada na atualização de 2021 na Estratégia Global de Gestão e Prevenção da Asma pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA), a asma é descrita como uma doença inflamatória crônica das vias aéreas em que os episódios sintomáticos compreendem sibilo, falta de ar, aperto no peito e tosse. Há ainda a exibição de variação ao longo do tempo e em intensidade para essas características clínicas. Esses sinais vêm acompanhados por limitação variável do fluxo aéreo expiratório (GINA, 2021).

Tradicionalmente a doença é caracterizada pela presença de um processo inflamatório nos pulmões que é modulado pela intensa presença de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, sendo a cronicidade desses eventos responsável por desencadear mudanças estruturais no pulmão cujas alterações são conhecidas como remodelamento das vias aéreas. Essas mudanças que ocorrem nas paredes e na luz da árvore traqueobrônquica contribuem negativamente com hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) e obstrução (às vezes reversível) do fluxo aéreo, conduzindo no conseqüente declínio da função pulmonar (MACHADO, 2012; TANG *et al.*, 2006).

Existem maiores chances de desenvolvimento da asma e de sua gravidade em indivíduos com predisposição genética combinada a fatores ambientais. Desse somatório é esperado uma ampla variedade de condições ocasionando na instauração da patogênese da asma, permitindo a essa doença respiratória exibir um perfil de heterogeneidade fenotípica (WENZEL, 2012). Tendo em vista a complexidade dos fatores envolvidos, a redução da função pulmonar pode ser gerada de inúmeras formas como por exposição a poluentes atmosféricos, exposição ativa e passiva à fumaça de cigarro, exposição à alérgenos ou irritantes ou, ainda, provocados por desencadeantes, como infecções virais, presença de comorbidades (obesidade), realização de exercícios, exposição a certos medicamentos (AAS ou outros AINEs) e vários outros. Somado a isso, o desenvolvimento da asma também pode ir de encontro a fatores de natureza biológica, como idade e sexo do indivíduo (HOLGATE *et al.*, 2015; KIM; UMETSU; DEKRUYFF, 2016)

A predisposição genética à hipersensibilidade alérgica é uma condição

manifestada por indivíduos atópicos, isto é, indivíduos cuja tendência aponta para uma sensibilização em resposta a exposição à alérgenos ambientais comuns e a produção de imunoglobulina E (IgE) específica subsequentemente (KER; HARTERT, 2009). Por essa razão, a presença de atopia torna esse grupo sujeito ao desenvolvimento de doenças alérgicas como a asma, sendo clinicamente fenotipada como asma alérgica por envolver níveis elevados de IgE (BORTOLOZZO, 2015; GINA, 2021). Existem outros fenótipos para a doença, porém o fenótipo clássico para a asma é reportado através desse, em razão de sua maior prevalência. A asma pode também ser dividida em dois subfenótipos principais, são eles: asma alérgica (perfil Th2) e asma não alérgica (não Th2). Os dois grupos relacionam-se com ativação de linfócitos Th0, se distinguindo apenas pelo perfil de diferenciação desses linfócitos e das citocinas envolvidas no processo. A diferenciação em asma alérgica resulta na presença de linfócitos Th2 e consequente secreção de citocinas tipo 2 por esses leucócitos. Porém, caso a célula T *naive* se diferencie em linfócitos Th1 ou Th17 será induzido em um perfil de inflamação neutrofílico decorrente da expressão de citocinas Th1 e Th17 (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013; MACHADO, 2012).

A expressão do subtipo celular que mediará à inflamação está relacionada à gravidade da doença. Portanto, apesar da patogênese da asma leve a moderada ser marcada pela presença de linfócitos T de perfil Th2 à medida que a doença se torna mais grave um subconjunto de células T CD4+ são recrutadas, sendo estas apropriadamente representadas pelos linfócitos T de perfil Th1/ Th17 (HOLGATE, 2008; NEWCOMB; PEEBLES JR, 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A asma representa uma importante doença das vias aéreas, devido a sua cronicidade, complexidade envolvida e o fato de acometer indivíduos em todas as partes do mundo e em todas as faixas etárias. Segundo dados recentes levantados pelo estudo *Global Burden of Disease* (GRD), a asma afeta aproximadamente mais de 330 milhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo globalmente a uma prevalência entre 1 e 18% entre os habitantes nos diferentes países (GINA, 2021; GAN, 2018).

De acordo com as diretrizes da *European Respiratory Society/ American Thoracic Society* a asma grave exhibe uma prevalência estimada em 5 a 10% do

número total de indivíduos asmáticos (CHUNG *et al.*, 2014). A doença em sua forma grave é definida como aquela cuja demanda engloba a administração de médias e altas doses do tratamento com corticosteróides inalatórios (ICS) associado a um segundo medicamento de controle (e/ou corticosteróides orais em dose baixa) de forma a se evitar que a asma se torne não controlada ou que permaneça sob descontrole mesmo na utilização da terapia. Esses pacientes asmáticos portadores de asma grave são conhecidos devido à resposta incompleta ao tratamento de comorbidades e da apresentação da condição de refratariedade aos corticosteróides, a chamada asma grave refratária (CONITEC, 2021; LAGO; VALE; GODOY, 2020).

As estimativas sugerem a persistência da mortalidade para a asma. Em 2016, cerca de 420.000 óbitos ocorreram em decorrência da doença, representando, por dia, mais de 1.000 mortes (GAN, 2018). No Brasil, somente em 2013 foram notificados 2.047 óbitos, acompanhado de 129.728 internações (PIZZICHINI *et al.*, 2020). Adicionalmente, com as informações extraídas do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus) para os anos de 2019 e 2020, foi demonstrada uma diminuição do número de óbitos e de hospitalizações por asma. Para esses dois últimos anos os falecimentos ficaram na ordem de 773 e as internações com 127.899 de abrangência. Essa diminuição é justificada pelo maior acesso que os indivíduos têm ao tratamento nos dias atuais. Entretanto, contrariando essa tendência, a taxa de mortalidade subiu de 52% para 60% comparando o ano de 2013 com os dois anos mais recentes (DATASUS, 2021). Em um estudo mais espaçado temporalmente, Brito (2018) demonstrou que a asma é responsável por causar, em média, 2.339 mortes, comprovando que por dia, aproximadamente 6 pessoas morrem em razão da doença.

1.3 FISIOPATOLOGIA DA ASMA

1.3.1 Inflamação das vias aéreas

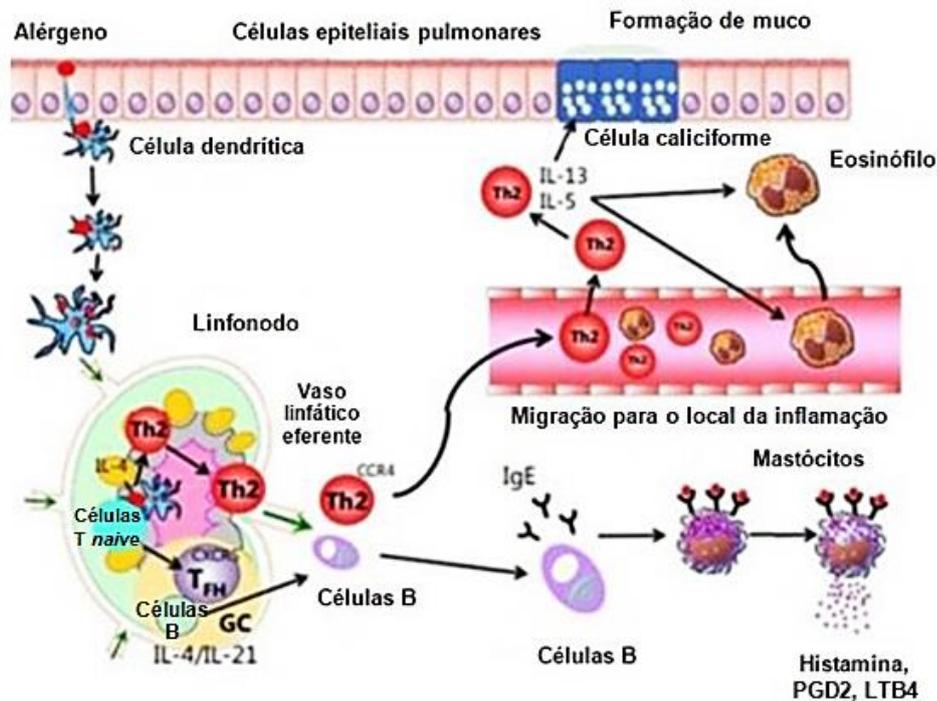
A exposição de um indivíduo predisposto a um alérgeno e/ou irritantes transportados no ar desencadeia o processo inflamatório. Esses antígenos ambientais são normalmente inócuos, ou seja, são bem tolerados pela maioria das pessoas. Entretanto, quando esse primeiro contato é feito por um indivíduo atópico dirige-se a um estágio denominado como sensibilização alérgica (GRAMMATIKOS, 2008).

Para que esse processo inicial obtenha êxito, certos tipos leucocitários são necessários, sendo, portanto, crucial a participação de células dendríticas (CDs) e linfócitos T (HOLGATE *et al.*, 2015). As células dendríticas são também conhecidas como células apresentadoras de antígeno (APCs), estando essa população especializada em apresentação de antígenos situada no epitélio das vias aéreas e na mucosa subjacente. O alérgeno inalado ao acessar tais compartimentos é capturado por células dendríticas e uma vez em seu interior ele é processado em peptídeos antigênicos menores adequados para ser expressos na superfície da APC complexados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013; VUOLO, 2016).

As células dendríticas imaturas sofrem ativação após a captação do antígeno, estando aptas a deixar o epitélio a partir desse momento. Desta forma, ocorre à migração dessas células para os gânglios linfáticos e apresentação subsequente do alérgeno processado (epítipo) aos receptores de células T CD4+ *naive* (Th0) via MHC de classe II. Essa sinalização permite que as células T sejam ativadas, havendo polarização para um perfil de resposta Th2, sendo isso possível pela participação de IL-4 (BUC *et al.*, 2009). Parte das células T *helper* tipo 2 ativadas migram para o folículo da célula B, sendo secretados nesse microambiente citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-13), associado a expressão de uma molécula co-estimulatória em sua superfície, o chamado CD40L. Essa molécula é ligante do CD40 expresso na superfície de células B. A mudança da classe de linfócitos B para produção de Imunoglobulina E (IgE) é sinalizada através dessa ligação, estando as interleucinas IL-4 e IL-13 igualmente envolvidas nesse processo (GRAMMATIKOS, 2008). Os

anticorpos específicos produzidos no folículo de célula B são liberados na circulação, ligando-se aos receptores de alta afinidade ($Fc\epsilon RI$) encontrados na superfície de mastócitos teciduais e basófilos circulantes, sensibilizando essas células efetoras (FELTON *et al.*, 2014; GALLI; TSAI, 2012; KUDO; ISHIGATSUBO; AOKI, 2013; TREVOR; DESHANE, 2014).

Figura 1 — Processo inflamatório encontrado nos pulmões



Fonte: adaptado de KUBO (2017).

A inflamação das vias aéreas na asma transcorre em duas etapas. A fase inicial, também conhecida como reação de hipersensibilidade imediata, é iniciada em função da exposição adicional ao alérgeno específico. Essa fase costuma durar entre 5 a 90 minutos, sendo marcada pela ativação de células efetoras através da ligação cruzada do alérgeno ao complexo $IgE-Fc\epsilon RI$ acoplado na membrana de mastócitos e basófilos. A resposta a essa ligação é a desgranulação dos grânulos citoplasmáticos dessas células, os quais armazenam importantes mediadores inflamatórios (KOMI; WÖHRL; BIELORY, 2019). A resposta inflamatória nas vias respiratórias inferiores por esses produtos biologicamente ativos é caracterizada por causar broncoconstrição, aumento da secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação local. A histamina, prostaglandina e

leucotrienos são alguns dos mediadores responsáveis por orquestrar esses eventos. Após terminado esse período imediato, a fase tardia é iniciada, sendo esta verificável ao longo das 3 a 12 horas seguintes (HOLGATE *et al.*, 2015). Nessa fase ocorrem recrutamento e ativação de mais leucócitos, especialmente eosinófilos, sendo o influxo dessas células favorecido pela presença de eotaxinas e IL-5. O remodelamento das vias aéreas e hiper-responsividade também é verificado, sendo consequência da resposta inflamatória gerada pela presença de citocinas Th2 liberadas por mastócitos e linfócitos T *helper* tipo 2 (BARNES, 2008; BROWN; WILSON; METCALFE, 2007; GALLI; TSAI, 2012).

As vias aéreas asmáticas apresentam acúmulo de células inflamatórias em razão do envolvimento dessas com o processo inflamatório gerado. Dentre essas, algumas se destacam por serem fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), sendo isso verificado para neutrófilos e eosinófilos principalmente (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006).

Naturalmente, o epitélio pulmonar é frequentemente exposto a espécies reativas. Essa exposição por sua vez é característica de um metabolismo normal, tendo em vista que os reativos expressos não atuam lesionando células e tecidos de maneira contínua pela existência de um equilíbrio redox no organismo ocasionado pelo envolvimento de espécies antioxidantes. Contudo, o quadro inflamatório crônico gerado pela doença é marcado por uma superprodução de espécies reativas em concordância com o infiltrado de células encontrado nas vias respiratórias inferiores. Por esse motivo, as defesas antioxidantes serão encontradas, em algum momento, sobrecarregadas de espécies reativas, desencadeando em um desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e a produção de espécies pró-oxidantes (COMHAIR; ERZURUM, 2010; SAHINER *et al.*, 2011). Esse desbalanço provocado é conhecido como estresse oxidativo, sendo causador de graves efeitos citotóxicos como a morte celular, além de lesão tecidual que acaba contribuindo com o remodelamento das vias aéreas (CHO; MOON, 2010). A presença de níveis aumentados de ROS e RNS na expectoração de um paciente asmático está também relacionada a aumento da secreção de muco, permeabilidade epitelial e contração do músculo liso brônquico (ROGERS; CISMOWSKI, 2018).

Para lidar com os radicais livres o organismo tem à sua disposição um sistema de defesa constituído de antioxidantes. A linha de defesa enzimática é composta principalmente de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e

glutathiona peroxidase (GPx), sendo também observado ativação de fatores de transcrição como outra importante forma de defesa antioxidante, como visto para o fator nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2). Esse último em situações de estresse oxidativo induzirá a transcrição gênica de diversas moléculas e enzimas com efeitos antioxidantes e citoprotetores aos pulmões (COMHAIR; ERZURUM, 2010; RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006).

1.3.2 Remodelamento das vias aéreas

O epitélio das vias aéreas exibe função de barreira física, servindo como interface entre o ambiente externo e o tecido pulmonar. Entretanto, o processo inflamatório em andamento na asma acaba comprometendo a integridade dessa barreira epitelial, sujeitando as vias aéreas a alterações estruturais importantes. Além da lesão epitelial, outras alterações também são descritas, sendo elas: metaplasia e hiperplasia de células caliciformes e das glândulas submucosas (aumento da produção de muco), hiperplasia e hipertrofia do músculo liso, espessamento da membrana basal (fibrose subepitelial) e aumento da vascularização das vias aéreas. Essas modificações estruturais sobre as propriedades normais do tecido são apropriadamente conhecidas por remodelamento das vias aéreas (BERGERON; TULIC; HAMID, 2010; GIRODET *et al.*, 2011; HIROTA; MARTIN, 2013)

A resposta inflamatória induzida por alérgenos inalantes é marcada pela presença de importantes mediadores envolvidos na remodelação. Um dos mediadores liberados pelas células epiteliais e por células infiltrantes, principalmente eosinófilos, é o fator de crescimento transformador β (TGF- β), tendo notável efeito na ativação de fibroblastos que irão desencadear em aumento da produção de matriz extracelular (MEC). Deve-se levar em consideração que os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos que promovem secreção de proteínas existentes na matriz, como colágeno e fibronectina (MICHALIK *et al.*, 2018). Esse fator de crescimento provoca a inibição da síntese de metaloproteases de matriz (MMPs) por favorecerem a formação de proteínas designadas à inibição dessas enzimas de degradação, os chamados inibidores de tecido de metaloproteases de matriz (TIMPs). Uma maior razão de inibidores de proteases sobre proteases dirige o

equilíbrio em direção ao aumento da deposição de matriz podendo desencadear fibrose pulmonar (TANG *et al.*, 2006).

O espessamento das paredes das vias respiratórias e o estreitamento do lúmen são resultados do processo de remodelamento. A diferenciação fenotípica das células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos provoca alterações na arquitetura pulmonar que contribui para o estabelecimento do quadro clínico asmático, que nesse primeiro momento é representado pela dificuldade respiratória. Existindo aqui a aquisição de um fenótipo contrátil e produtor de colágeno observado para os fibroblastos na sua diferenciação em miofibroblastos. Outra diferenciação fenotípica importante para o remodelamento é visualizada também, havendo modulação desta pelos produtos da via Th2. Logo, interleucinas como IL-4, IL-9 e IL-13 direcionarão a diferenciação de células epiteliais para a de células caliciformes, exibindo ação tanto para a hiperplasia de células caliciformes como para a expressão do gene da mucina, permitindo o aparecimento de mais células produtoras de muco e a deposição deste produto sobre as vias aéreas. Comentários também são levantados sobre as células musculares lisas diminuírem a expressão para proteínas contráteis visando à aquisição de uma capacidade proliferativa, no entanto essa questão ainda permanece controversa (TANG *et al.*, 2006).

1.4 TERAPIA DA ASMA

A asma é descrita como uma enfermidade incurável, sendo o seu manejo concentrado na redução da inflamação das vias aéreas por meio do uso regular de tratamento destinado a prevenção e no alívio dos sintomas para quando houver estreitamento da luz das vias aéreas (NICE, 2017).

Essa inflamação crônica existente nas vias aéreas asmáticas pode ser suprimida na maioria dos casos pela administração de agentes anti-inflamatórios esteroides inalatórios, e, devido a atividade desempenhada por esses fármacos, os corticosteróides inalatórios (ICS) são reconhecidos como medicamentos de controle base para a terapia, já que são extremamente eficazes na redução da inflamação, com consequente melhora da função pulmonar, culminando no controle dos sintomas e diminuição dos riscos do aparecimento de exacerbações futuras (CONITEC, 2021). Para pacientes com sintomas menos frequentes (duas vezes por semana ou menos) o uso de ICS como controlador diário também acontece por ele

permitir com que seja reduzida a utilização de β 2-agonistas de curta ação (short-acting β 2-agonists – SABAs), sendo esse último usado frequentemente no manejo inicial para proporcionar alívio dos sintomas (GINA, 2021). Admite-se preferência pela via inalatória por esta levar a maior efeito local, diminuindo a necessidade de utilização de maiores doses do medicamento para o efeito benéfico ser alcançado. Inclusive, a adoção de uma menor dose relaciona-se a uma menor incidência de efeitos adversos sistêmicos, já que baixas concentrações do fármaco alcançarão a corrente sanguínea (TATTERSFIELD *et al.*, 2002).

Entretanto, conforme é dado o agravamento da doença, os sintomas passam a não ser mais controlados por baixas doses de ICS. Nesse momento, torna-se indispensável para uma boa efetividade a associação de broncodilatadores β 2-agonistas de longa duração (long-acting β 2-agonists – LABAs) a terapia (CAMPOS; CAMARGOS, 2012). Os β 2-agonistas levam a uma melhora na obstrução do fluxo aéreo, sendo preconizado a combinação de ICS + LABA por essa permitir trazer no melhor controle da asma, tendo em vista o potencial efeito anti-inflamatório alcançado pelo sinergismo existente entre esses dois medicamentos (CONITEC, 2021).

Apesar da associação de ICS + LABA ser frequentemente utilizada para tratamento da asma moderada e grave, estágios mais críticos passarão a exigir uma segunda linha de broncodilatadores sendo então utilizados antagonistas muscarínicos de longa ação (long-acting muscarinic antagonists – LAMAs). Se mesmo assim o descontrole dos sintomas for observado são adotadas doses baixas de glicocorticoides orais para conter a forma mais grave da doença, no entanto essa escolha acaba corroborando com uma maior ocorrência de efeitos adversos (GINA, 2021). Na ausência de respostas às intervenções prescritas, os pacientes com asma de difícil tratamento precisarão passar por fenotipagem para que seja avaliada a inserção de uma terapia complementar, esta devidamente representada pela inclusão de imunobiológicos. Portanto, havendo constatação de um fenótipo inflamatório o tratamento poderá ser realizado com anticorpo anti-Imunoglobulina E (omalizumabe) ou anti IL-5 (mepolizumabe), respectivamente aplicados em quadros graves de asma alérgica e eosinofílica. Entretanto, maiores custos serão observados com a adoção dessas terapias (CONITEC, 2021).

Nesse cenário onde a asma grave é inserida é possível que certos pacientes sequer respondam aos glicocorticoides, sendo a ausência dos efeitos anti-

inflamatórios gerados por essa classe comuns ao quadro de asma refratária a glicocorticoides (ADCOCK; BARNES, 2008).

Tabela 1 – Etapas de tratamento da asma

ETAPAS I - II	TRATAMENTO PREFERENCIAL: Dose baixa de ICS + FORM de resgate ou Dose baixa de ICS + SABA de resgate
ETAPA III	TRATAMENTO PREFERENCIAL: Dose baixa de ICS + LABA
ETAPA IV	TRATAMENTO PREFERENCIAL: Dose média de ICS + LABA
ETAPA V	TRATAMENTO PREFERENCIAL: Dose alta de ICS + LABA OUTRAS OPÇÕES: Adicionar LAMA Adicionar CO em dose baixa Fenotipar: anti-IgE (associar omalizumabe em caso de asma alérgica grave) / anti-IL-5 (associar mepolizumabe em caso de asma eosinofílica grave)

ICS: corticosteroides inalatórios; FORM: formoterol; SABA: broncodilatador β 2-agonista de curta ação; LABA: broncodilatador β 2-agonistas de longa duração; LAMA: broncodilatador antagonista muscarínico de longa ação; Anti-IgE: anti-Imunoglobulina E; Anti-IL5: anti-Interleucina-5; CO: corticosteroide oral. Fonte: Elaboração própria baseada no Relatório de recomendação: Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas da Asma, Conitec (2021).

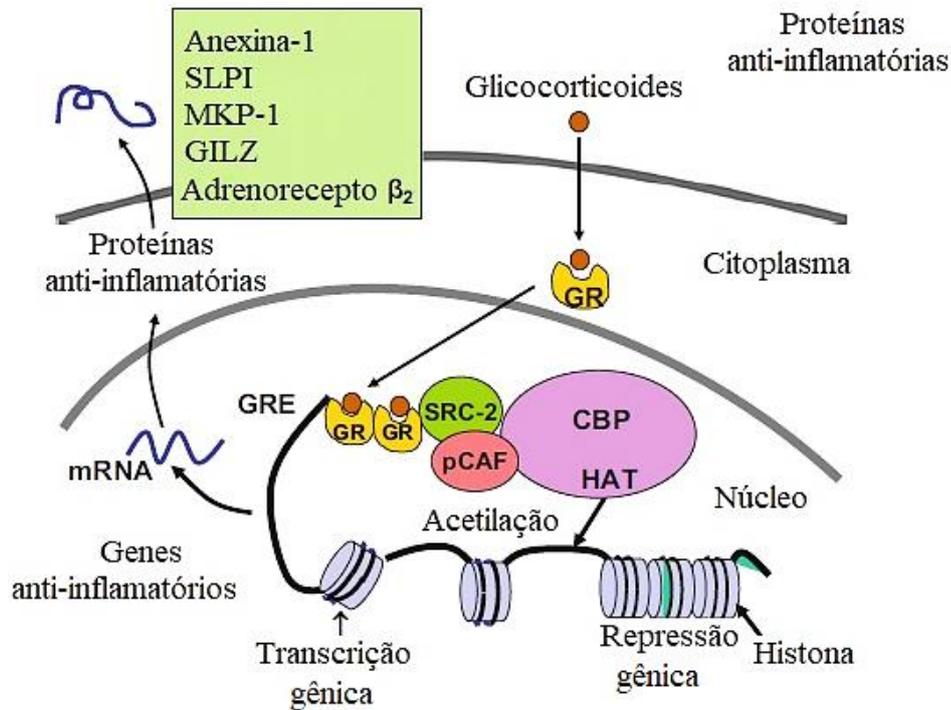
1.4.1 Glicocorticoides

Os glicocorticoides (GC) são também chamados hormônios esteróides por serem moléculas derivadas do metabolismo do colesterol (WILLIAMS, 2018). Esses medicamentos anti-inflamatórios esteroidais são frequentemente prescritos para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas, como a asma, doença inflamatória intestinal e artrite reumatóide, já que conseguem suprimir

significativamente a resposta inflamatória (INGAWALE; MANDLIK; PATEL, 2015; KEENAN *et al.*, 2012).

A ação dos glicocorticoides é baseada em dois diferentes mecanismos moleculares, são eles: os mecanismos não genômicos e genômicos, este último se divide ainda na chamada transativação gênica (aumento da expressão de genes anti-inflamatórios) e transrepressão gênica (diminuição de genes pró-inflamatórios) (KEENAN *et al.*, 2012). A atuação dos glicocorticoides na transcrição dos genes é dependente da ligação do fármaco a proteínas receptoras específicas, denominadas receptores de glicocorticoides (GR). Para que essa interação ocorra, após administrado, o glicocorticoide será conduzido até o interior das células através de sua difusão pela membrana plasmática, permitindo a realização de uma ligação com o receptor intracelular de glicocorticoides. Com a formação do complexo glicocorticoide-GR o receptor é ativado e a sua conformação alterada, provocando sua dissociação das proteínas chaperonas que na ausência de ligantes formavam um complexo citoplasmático com esse receptor. Em seguida, visando exercer seus efeitos moleculares o complexo sofre homodimerização e é translocado até o núcleo pela ajuda de proteínas de importação nuclear (importina- α , importina-7 e importina-13) (BARNES, 2016). No núcleo, o complexo glicocorticoide-GR passa a fazer ligação com sequências específicas do DNA, os chamados elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE) (ADCOCK; CARAMORI; KIRKHAN, 2012; BRUNTON, 2012). A interação do dímero GR ativado ao GRE permite recrutar moléculas co-ativadoras da transcrição como o fator ativador p300/CBP (pCAF), coativador do receptor de glicocorticoides-2 (SRC-2) e a proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CBP) que irão conduzir no disparo para a acetilação das histonas já que apresentam atividade para a enzima histona acetiltransferase (HAT) assegurando, desta forma, a transcrição de genes anti-inflamatórios. Esse mecanismo molecular é denominado transativação (BARNES, 2006).

Figura 2 — Mecanismo de ação dos glicocorticoides através do processo de transativação gênica.



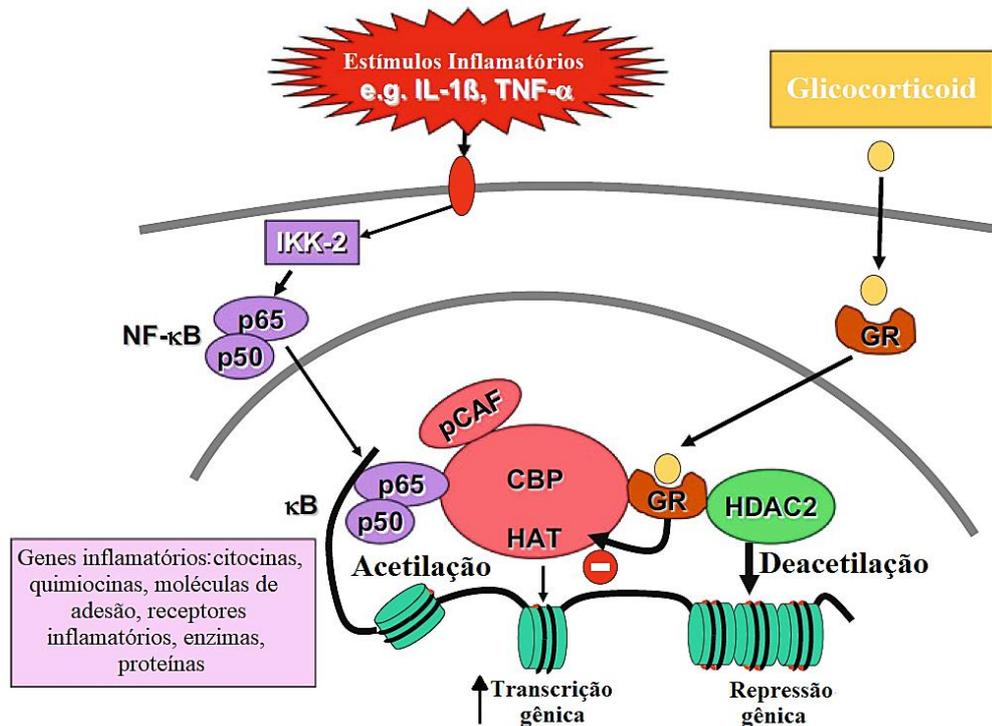
Fonte: adaptado de BARNES (2011).

Como demonstrado na figura acima, parte da atuação dos glicocorticoides é dependente de uma maior expressão de proteínas anti-inflamatórias, sendo a transcrição desses genes dependente da atividade da enzima HAT. Tal enzima utiliza o DNA como substrato permitindo trazer em sua exposição, já que em repouso o DNA é encontrado enovelado em torno de proteínas especiais (histonas), porém na promoção da acetilação das histonas a estrutura passa por um processo de desenrolamento. Com a estrutura aberta, os fatores de transcrição estão aptos a se ligar em regiões alvo, permitindo levar a síntese de proteínas anti-inflamatórias (BARNES, 2006).

Adicionalmente, o glicocorticoide pode favorecer a condensação do DNA para que a transcrição de proteínas pró-inflamatórias seja reduzida. Aqui, o processo é mediado pela enzima histona desacetilase-2 (HDAC-2) sendo a sua participação necessária para essa regulação (BARNES, 2011), já que levará na inibição da HAT. Como resultado desse DNA enrolado, o acesso de moléculas co-ativadoras a

sequências específicas para transcrição de proteínas pró-inflamatórias é reduzido, favorecendo o mecanismo molecular de transrepressão, reprimindo, deste modo, a transcrição de genes pró-inflamatórios (Figura 3) (KEENAN *et al.*, 2012).

Figura 3 — Mecanismo de ação dos glicocorticoides através do processo de transrepressão gênica.



Fonte: Adaptado de BARNES (2011).

Sabe-se, atualmente, que os processos de acetilação e desacetilação das histonas são mecanismos de ação importantes para os glicocorticoides, abrindo expectativas para que os mecanismos moleculares associados à resistência a glicocorticoides sejam melhor compreendidos. Por esse motivo, estão surgindo investigações em cada uma dessas fases, visando à verificação do provável envolvimento sobre a condição de refratariedade a glicocorticoides comum a algumas doenças, incluindo a asma (DURHAM; WIEGMAN; ADCOCK, 2011).

1.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS GLICOCORTICOIDES

Pacientes com asma grave necessitam da administração de doses mais altas de corticosteroides inalatórios e, em seguida, dos corticosteroides sistêmicos para

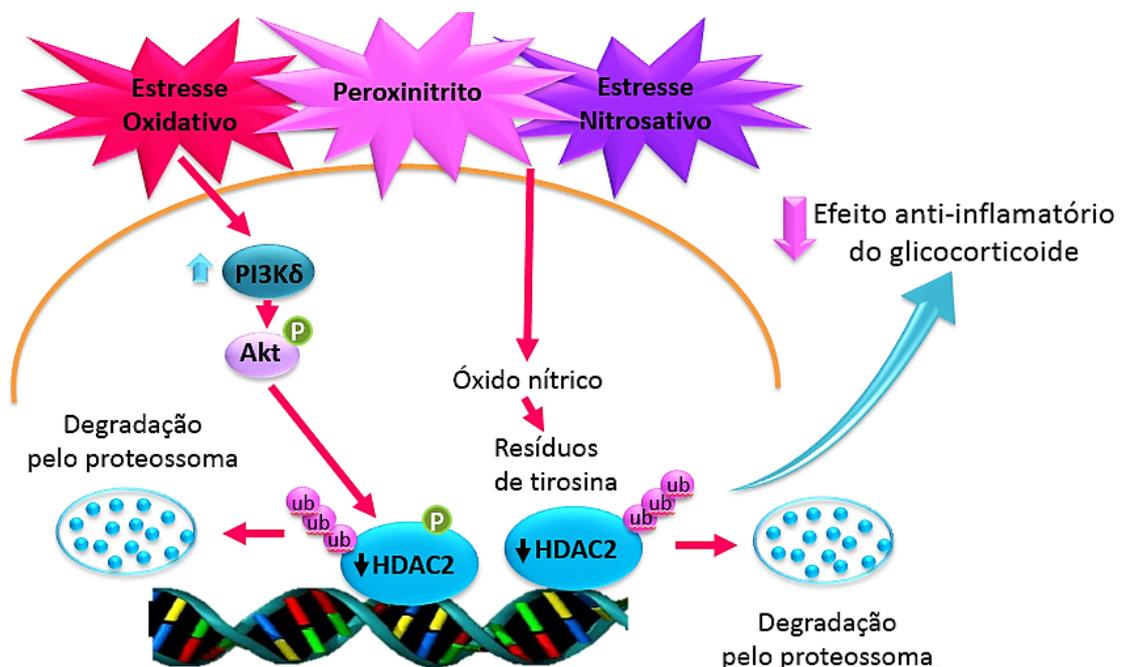
que seja possível controlar a doença. Isso ocorre devido os asmáticos inseridos nesse grupo, de maneira contrária aos pacientes com asma leve a moderada, exibirem uma resposta pobre aos glicocorticoides. Esta condição sinaliza que a modalidade grave da inflamação asmática é relativamente resistente aos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides. A completa resistência, também nomeada como insensibilidade, define os asmáticos como esteroide-resistentes (BARNES, 2013; LEWIS *et al.*, 2021).

Embora a gravidade do quadro esteja associada à resistência a corticoterapia, a eficácia da intervenção também é limitada nos pacientes com tratamento de longo prazo com anti-inflamatórios esteroidais. Como os efeitos adversos desse tratamento podem ser graves o bastante para afetar a terapia é esperado uma sensibilidade reduzida e, na sua evolução, a não responsividade aos esteróides (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013). Visando justificar essa resposta terapêutica inadequada, diversos mecanismos moleculares subjacentes as ações dos glicocorticoides foram elucidados, podendo ser atribuído a anormalidades genéticas em GRs, expressão reduzida de GR- α , diminuição da afinidade de GR pelo ligante, redução da translocação nuclear de GR devido à expansão da fosforilação por quinases (p38 MAPK e JNK), expressão e atividade de HDAC-2 reduzida, aumento da expressão de GR- β , expressão aumentada de fatores de transcrição pró-inflamatórios (FTs: NF- κ B e AP-1) e redução no número de células T regulatórias (HENDERSON *et al.*, 2020; INGAWALE; MANDLIK; PATEL, 2015)

A sinalização pró-inflamatória aumentada contribui para a insensibilidade aos glicocorticoides e sob condições de estresse essa via é regulada positivamente (LEWIS *et al.*, 2021). Como efeito da combinação dos estresses oxidativo e nitrosativo, altas quantidades de óxido nítrico (NO \cdot) produzidas por ação da forma induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) passam a reagir com o superóxido (O $_2^{\cdot-}$) levando a formação de peroxinitrito (ONOO $^-$), um ânion altamente reativo e tóxico (CARAMORI; PAPI, 2004; COLEMAN, 2002; SUGIURA *et al.*, 2008). Resíduos de tirosina (Tyr) em HDAC-2 são alvos de nitração, comprometendo a atividade desta enzima, já que essa reação é dada de maneira irreversível, conduzindo, portanto, HDAC-2 para inativação, ubiquitinação e degradação proteossomal. Existe, ainda, outra via de sinalização por onde os níveis de HDAC-2 podem ser reduzidos. A inibição da enzima nesse novo cenário é atribuída à ativação da fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K) δ via estresse oxidativo. PI3K δ ativada conduz a fosforilação da

proteína quinase B (AKT), levando a ativação da AKT (pAKT) e a sua translocação nuclear. Uma vez que pAKT está no núcleo é conduzida a fosforilação e ubiquitinação de HDAC-2, seguida de sua inativação e degradação proteossomal. A ação repressiva dos glicocorticoides no processo de transcrição pró-inflamatório associado à NF- κ B e AP-1 é dada através do recrutamento de HDAC-2, entretanto tal processo é inviabilizado pela expressão e atividade de HDAC-2 estarem diminuídas. Em função da modificação da expressão do cofator (PI3K δ) afetar negativamente a enzima HDAC-2, o equilíbrio entre a transcrição de genes inflamatórios e anti-inflamatórios é afetado, sendo este deslocado em razão dessas alterações para um estado pró-inflamatório (BARNES, 2013; HENDERSON *et al.*, 2020; KEENAN *et al.*, 2012) A inflamação das vias aéreas torna-se, portanto, resistente as ações anti-inflamatórias dos glicocorticoides (BARNES, 2011).

Figura 4 – Mecanismo de refratariedade despertado pela redução da expressão de HDAC-2



Fonte: Adaptado de Barnes (2013).

Sem a possibilidade de conter a atividade transcricional do NF- κ B e AP-1 não há como bloquear a síntese de diversas proteínas pró-inflamatórias. As citocinas são um desses produtos de síntese e o aumento dos seus níveis, sobretudo IL-2, IL-4 e

IL-13, são capazes de afetar células T e monócitos, acarretando na redução da afinidade de ligação do receptor intracelular GR pelo GC, contribuindo também para a diminuição da translocação nuclear desse receptor. A combinação dessas citocinas inflamatórias induz resistência aos esteróides *in vitro*, devido à propriedade em aumentar a atividade da proteína quinase ativada por mitogênio p38 (MAPK) (BARNES, 2010; TREVOR; DESHANE, 2014).

A função GR pode ser reduzida por meio da fosforilação desse receptor por quinases, mais significativamente p38MAPK. A fosforilação de GR é uma das modificações pós-tradução (PTM) existentes, causando alteração de afinidade de GR- α pelo seu ligante e redução da capacidade de GR de se ligar ao DNA, uma vez que a importação nuclear de GR está igualmente prejudicada (CRUZ-TOPETE; CIDLOWSKI, 2015; VANDEVYVER; DEJAGER; LIBERT, 2014). Além disso, a família de proteínas MAPK não se restringe apenas a p38, JNK também está envolvida na mesma via de sinalização. Sob condições de estresse oxidativo e lesão celular essas quinases podem ser ativadas diretamente pela sinalização de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), desencadeando posteriormente na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios. A superexpressão de NF- κ B e AP-1 favorecem a diminuição da sensibilidade aos glicocorticoides, já que o potencial de transativação do GR é reduzido (BARNES, 2011; LEWIS *et al.*, 2021).

A sensibilidade aos glicocorticoides também é modulada por GR- β . A literatura descreve que duas isoformas principais de GR são codificadas a partir do gene humano (NR3C1), sendo diferenciadas através do domínio de ligação ao ligante (LBD) (CRUZ-TOPETE; CIDLOWSKI, 2015). O receptor funcional de glicocorticoides funciona como um fator de transcrição dependente de ligante. Como GR- α é a forma de GR que se liga aos glicocorticoides ele é também o subtipo responsável pelas ações do GC, sendo a representação da isoforma biologicamente ativa (LEVENTHAL *et al.*, 2019). A presença de um LBD mais curto em GR- β (35 aminoácidos a menos que a isoforma α) inviabiliza a codificação da hélice 12 que é de extrema importância para a formação de uma bolsa hidrofóbica necessária para a ligação com GCs (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; TIMMERMANS; SOUFFRIAUX; LIBERT, 2019). Logo, GR- β não interage com o GC, mas apesar dessa limitação a isoforma β regula a atividade dos GCs por funcionar como um antagonista de GR- α , competindo pela ligação a GREs, mas sem capacidade para induzir sua transcrição. Em consonância com isso, a expressão aumentada de GR- β induzida pelo aumento

dos níveis de citocinas pró-inflamatórias provoca reduções na razão GR- α /GR- β celular e ativação de várias vias inflamatórias (como de NF- κ B), contribuindo para a corticoresistência (BARNES, 2011; SCHECHOWITSCH; LEITE; ASSREUY, 2017; RAMOS-RAMÍREZ; TLIBA, 2021).

As mutações ou polimorfismos no gene do receptor de glicocorticoide humano (hGR) (NR3C1) são outras condições que podem resultar no comprometimento dos mecanismos moleculares de ação do GR- α . Essas variações nas regiões codificantes e regulatórias do gene provocam alterações na sensibilidade do tecido aos glicocorticoides, podendo ser indicativo de hipersensibilidade ao GC ou resistência. A resposta insatisfatória ao tratamento está relacionada a algumas dessas anormalidades, como revelado nos polimorfismos ER22/ 23EK, GR-9 β e A3669G e nas mutações V423A, V575G e H726R por reduzirem a atividade transcricional induzida por GR- α (NICOLAIDES, 2016; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013; VANDEVYVER; DEJAGER; LIBERT, 2014; VITELLIUS; LOMBES, 2020).

Em vista do exposto, estudos direcionados a condição de insensibilidade a glicocorticoides são necessários para fornecer uma melhor compreensão dessa importante barreira no tratamento da asma. Como não existem muitos modelos que simulam todas as características da asma refratária a GC, e a maior parte dos mecanismos associados a esta condição foram descritos com base em ensaios *in vitro*, é muito importante que se desenvolvam modelos animais fidedignos que possam ser utilizados tanto para estudar os mecanismos relacionados à refratariedade a GC, quanto para serem utilizados na triagem de fármacos anti-inflamatórios alternativos.

Para tanto, esse trabalho tem como propósito estudar o desenvolvimento da refratariedade a glicocorticoide em modelo murino de asma crônica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com budesonida sobre as vias aéreas dos camundongos em protocolos experimentais de asma sensível e resistente a glicocorticoides.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos A/J desafiados cronicamente com OVA e tratados com budesonida, através da utilização do sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro pelo método invasivo;
- Examinar o efeito da exposição crônica a OVA e da administração de budesonida como tratamento sobre as alterações histológicas pulmonares, com foco em fibrose peribronquiolar e geração de muco;
- Quantificar as citocinas e quimiocinas pulmonares produzidas em resposta ao desafio crônico com OVA e o efeito do tratamento com o glicocorticoide budesonida na reversão dessa formação;
- Analisar a ocorrência de estresse oxidativo em pulmões de animais A/J com asma induzida por OVA, através da quantificação do biomarcador malondialdeído e da atividade da enzima antioxidante catalase, concomitantemente com o efeito do tratamento com budesonida na reversão dessa condição.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Animais

Para esse estudo foram utilizados machos de camundongos da linhagem A/J, com peso entre 18-20 g. Os espécimes foram fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ. Após serem recebidos, os animais foram confinados em gaiolas coletivas apropriadas para roedores com capacidade máxima para 5 animais e mantidos no biotério do departamento de Fisiologia e Farmacologia pertencente a mesma instituição. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Inflamação (LABINFLA). Com relação ao acondicionamento dos animais este foi feito em um ambiente sob condições padrões (Temperatura: 25-28°C; Fotoperíodo de 12 horas claro-escuro (06:00/18:00 h) e livre acesso a água e ração). Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA – número da licença L0030/15) e os experimentos conduzidos de acordo com os princípios éticos que medeiam à experimentação animal.

2.2.2 Protocolo de asma sensível e refratária a glicocorticoides

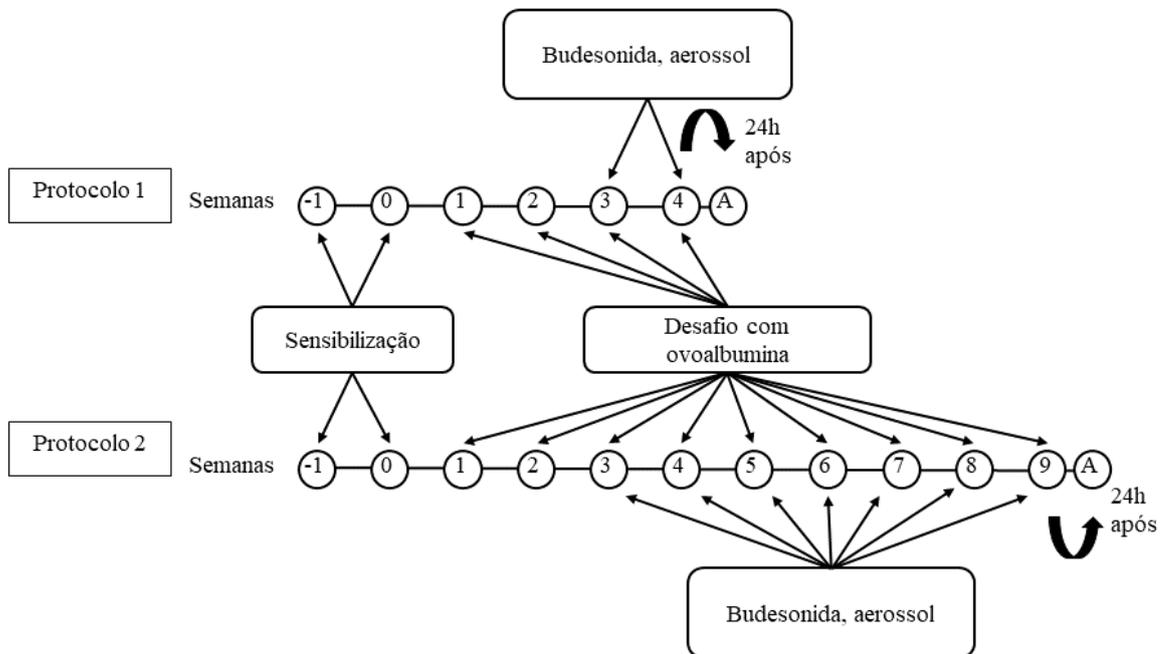
2.2.2.1 Sensibilização e desafio antigênico

Os camundongos foram sensibilizados através de duas injeções subcutâneas dorsais contendo 50 µg de OVA e 5 mg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), encontrados em um volume final de 0,2 mL de salina estéril (NaCl, 0.9%) fornecido por animal, sendo respeitado um intervalo de 7 dias entre as sensibilizações. Completado uma semana da última sensibilização, os animais foram anestesiados com aerossol de isoflurano sendo posteriormente submetidos ao desafio intranasal (i.n.) com OVA (50 µg/ 25 µL de salina), esta administrada 1 vez por semana, durante 4 semanas (protocolo de asma sensível a glicocorticoide) ou 9 semanas (protocolo de asma refratária a glicocorticoide) seguidas. Para os grupos controle foi utilizado o veículo, salina, em substituição a OVA. Os animais foram avaliados depois de transcorridos 24 h da última provocação antigênica.

2.2.2.2 Tratamento com budesonida

Tendo em vista que as alterações fisiopatológicas da asma já estão bem estabelecidas na terceira semana de desafio antigênico, os animais são tratados a partir desse período. O glicocorticoide escolhido para o tratamento nesse modelo foi a budesonida, sendo a administração com o fármaco realizado 1 h antes de cada instilação nasal com OVA, na concentração de 7,5 mg/mL por aerossol durante 30 minutos. O desenho do protocolo experimental está representado na figura 5.

Figura 5 — Protocolos experimentais de asma



Protocolo 1: protocolo de asma sensível ao tratamento com glicocorticoide; Protocolo 2: protocolo de asma refratária ao tratamento com glicocorticoide. Fonte: O autor (2021).

2.2.3 Avaliação da função pulmonar

2.2.3.1 Avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina por pletismografia invasiva

Para avaliação da função pulmonar os camundongos foram submetidos ao método de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo, realizado depois de transcorrido 24 h do último desafio com ovoalbumina. Completado as 4 ou 9

semanas de sensibilização e provocação com OVA (ou veículo) os animais que haviam resistido a esse protocolo de asma sensível ou refratária foram anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) e, posteriormente, suas traquéias expostas através de uma incisão transversal entre dois anéis fibrosos, permitindo, desta forma, a introdução de uma cânula traqueal. Após isso, os animais foram inseridos em uma câmara pletismográfica, onde a cânula de traqueostomia foi conectada a um pneumotacógrafo. Para que os animais fossem ventilados mecanicamente eles foram tratados previamente com brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/kg) o que resultou na paralisação de suas musculaturas respiratórias, impedindo que houvesse interferências na geração dos dados provocado por esforço respiratório. As informações referentes ao fluxo aéreo foram coletadas pelo pneumotacógrafo e transferidas para um computador para que fossem processadas e armazenadas. Para o êxito no processamento desses dados foi necessário a utilização do software BioSystem XA, onde, nessa fase, foi permitido coletar os parâmetros de resistência e elastância (HOYMANN, 2007). Para verificar se as vias aéreas tiveram desenvolvimento de hiper-reatividade, os camundongos foram colocados na presença de aerossóis de PBS (Tampão fosfato salina - veículo) e, subsequentemente, a provocações em concentrações crescentes (3, 9 e 27 mg/mL) de metacolina (agente constritor) que foram realizadas respeitando um intervalo de 5 minutos.

2.2.4 Análises histológicas

2.2.4.1 Confeção dos cortes pulmonares para avaliação histopatológica

Após o término do ensaio de broncoespasmo colinérgico os camundongos foram anestesiados com uma dose letal de tiopental (500 mg/Kg). Realizada a eutanásia, é feito a assepsia dos animais com etanol 70% e, em seguida, a cavidade peritoneal é aberta e a artéria abdominal seccionada para que o sangue retido possa ser desprezado. Com a finalidade de elucidar os eventos relacionados à evolução da inflamação pulmonar há a necessidade de remoção do pulmão íntegro para que a caracterização histopatológica possa ser iniciada. Para isto, o tórax do animal foi aberto com o intuito de promover acesso aos órgãos por ele protegidos. Nesta fase, é necessário promover a eliminação do sangue presente nos pulmões para que a

amostra possa ser recolhida para análise. Os animais foram, então, submetidos à técnica de perfusão que é dada pela introdução de um escalpe no ventrículo direito do coração, por onde é administrada uma solução de salina + EDTA (20 mM).

Depois da lavagem pulmonar, o lobo esquerdo foi cuidadosamente removido e fixado em Formalina-Milloning para que a composição do tecido e sua morfologia fossem preservadas (CARSON; MARTIN; LYNN, 1973). A seguir, a amostra foi incluída em parafina e depois de endurecido os blocos de parafina contendo em seu interior tecido pulmonar foram cortados (3 μ m) em micrótomo. Ao final os cortes histológicos obtidos foram colocados sobre lâminas e corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar a produção de muco, e Tricômico de Gomori (TG) para evidenciar a deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos.

2.2.4.2 Quantificação da produção de muco por morfometria digital

Para quantificar a área ocupada por muco no pulmão foi necessário proceder com a técnica de morfometria digital onde, para esta análise, as secções de tecido pulmonar precisaram estar coradas com PAS. Subsequentemente foi conduzido à visualização em microscopia de luz através da objetiva de 40x, sendo as imagens de todas as vias aéreas existentes nos cortes histológicos coletadas em uma microcâmara acoplada ao microscópio. As imagens digitais foram analisadas através do software image Pro-plus® utilizado para detectar faixas de cores específicas, possibilitando que a presença de padrões específicos atribuídos a coloração magenta e associado à presença de muco tenham a área calculada. Ferramentas do programa são utilizadas para que a análise seja limitada apenas a região do epitélio bronquiolar, sendo selecionados para compor essa avaliação ao menos 8 vias aéreas de cada animal.

2.2.4.3 Quantificação da fibrose subepitelial por morfometria digital

As fatias das vias aéreas também foram coradas com Tricômico de Gomori, visando mensurar a área de tecido pulmonar comprometida pela deposição de fibras colágenas, sendo obtidas tais informações ao utilizar a técnica de morfometria digital em microscopia de luz no aumento de 40x. As imagens das vias aéreas coradas em TG foram capturadas pela câmera de vídeo acoplada ao microscópio e analisadas

através do software image Pro-plus® utilizado para detectar faixas de cores específicas, possibilitando que a presença de padrões específicos atribuídos a coloração azul-esverdeada e associado à presença de fibrose tenham a área calculada. Ferramentas do programa foram utilizadas para que a análise seja limitada apenas a região que circunda a membrana basal das vias aéreas, excluindo o epitélio bronquiolar, sendo selecionados para compor essa avaliação ao menos 8 vias aéreas de cada animal.

2.2.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas pulmonares

As quantificações das citocinas IL-4, IL-13, eotaxina-1 e eotaxina-2 foram realizadas a partir de homogenato (amostra de células) de pulmão de camundongos. Para proceder com esta análise, fragmentos do pulmão direito foram removidos depois de transcorrido 24 h do último desafio antigênico e só após o órgão ter sido perfundido com 20 mM de solução salina + EDTA através do coração. Posteriormente, as amostras foram pesadas e homogeneizadas em 1 mL de solução tampão de lise celular visando prepará-las para a detecção do número de proteínas existentes na amostra. A solução de lise usada era composta por um coquetel de inibidores de proteases (complete-Roche) associado ao Triton X-100 (0,1%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS (1x). Na sequência, as amostras de homogenatos foram centrifugadas a 4°C por 10 min a 3500 rpm. Logo após, os sobrenadantes são recolhidos, aliquotados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer para posterior quantificação de citocinas e quimiocinas. A produção desses mediadores foi detectada através da utilização do método imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), seguindo os protocolos especificados nos kits comerciais do fabricante.

Resumidamente, placas de 96 poços para cada citocina foram sensibilizadas utilizando anticorpos monoclonais específicos (nas concentrações recomendadas pelos kits) e incubadas por 18 h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas com tampão e os sítios inespecíficos bloqueados com 1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS durante 1 h. Foram adicionadas posteriormente nas placas às amostras, etapa que durou 1 h à temperatura de 4°C. Novamente, as placas foram lavadas com tampão para incorporação do anticorpo de detecção, permanecendo incubada por 1 h para aderência. Após este período, as

placas foram conduzidas a uma terceira lavagem e incubadas por 1 h com a enzima estreptoavidina (Pierce Protein Biology Products, Thermo Scientific). Para que a revelação ocorresse o substrato (K-blue) foi adicionado, permitindo iniciar uma reação colorimétrica, bloqueada posteriormente pela adição de H₂SO₄ (0,19 M). Para realização da leitura das placas foi adotado o espectrofotômetro (*Versamax-Molecular Devices*) no comprimento de onda de 450 nm.

2.2.6 Avaliação do quadro de desequilíbrio redox

2.2.6.1 Preparo das amostras

Fragmentos do pulmão direito de camundongos foram macerados em um volume de 0,5 mL de tampão KPE (fosfato de potássio + EDTA, pH 7,5), e centrifugados a 2377 rpm por 10 min à 4°C. As análises foram direcionadas a fração sobrenadante, sendo esta recolhida após o cumprimento do tempo destinado a centrifugação, e utilizada para prever a atividade da enzima catalase e para quantificar os níveis do biomarcador malondialdeído (MDA).

2.2.6.2 Avaliação da atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) é determinada através da medida de degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), estando, portanto, a sua atividade, diretamente proporcional a taxa de H₂O₂ consumida. O decaimento de concentrações conhecidas do composto é monitorado a partir do primeiro minuto de reação. Para o prosseguimento do ensaio foram separados 25 mL de água destilada e 40 µL de peróxido de hidrogênio para que um “MIX” fosse preparado. Subsequentemente, foram incorporados em uma placa UV, 1 µL de amostra e 99 µL do MIX por poço. Um espectrofotômetro (*SpectraMax M5 – Molecular Devices*) em uma absorvância de 240 nm foi utilizado para a leitura das amostras. Os valores são apresentados por U/mg de proteína.

2.2.6.3 Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

O método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) é utilizado para a quantificação dos níveis de malondialdeído, por servir como parâmetro de peroxidação lipídica (DRAPER; HADLEY, 1990). A técnica consiste em aquecer a amostra sob condições ácidas, na presença de ácido tiobarbitúrico (TBA) para que este possa reagir com o MDA, dando origem a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico que são estimados através de espectrofotometria (BUEGE; AUST, 1978). A amostra é preparada com a incorporação de 100 µL de ácido tricloroacético a 10% em 100 µL do homogeneizado de tecido. Posterior a essa etapa as amostras são centrifugadas a 5822 rpm por 15 min a 4°C, sendo o sobrenadante removido ao final dessa fase. Antes dessas amostras serem deixadas em banho-maria a seco (95°C, 10 min) para serem aquecidas são acrescentados 150 µL de TBA. Um espectrofotômetro (*SpectraMax M5* – Molecular Devices) em uma absorvância a 532 nm é usado para determinar os níveis de MDA, sendo esses valores expressos adequadamente por nmol/mg de proteína.

2.2.7 Análise estatística

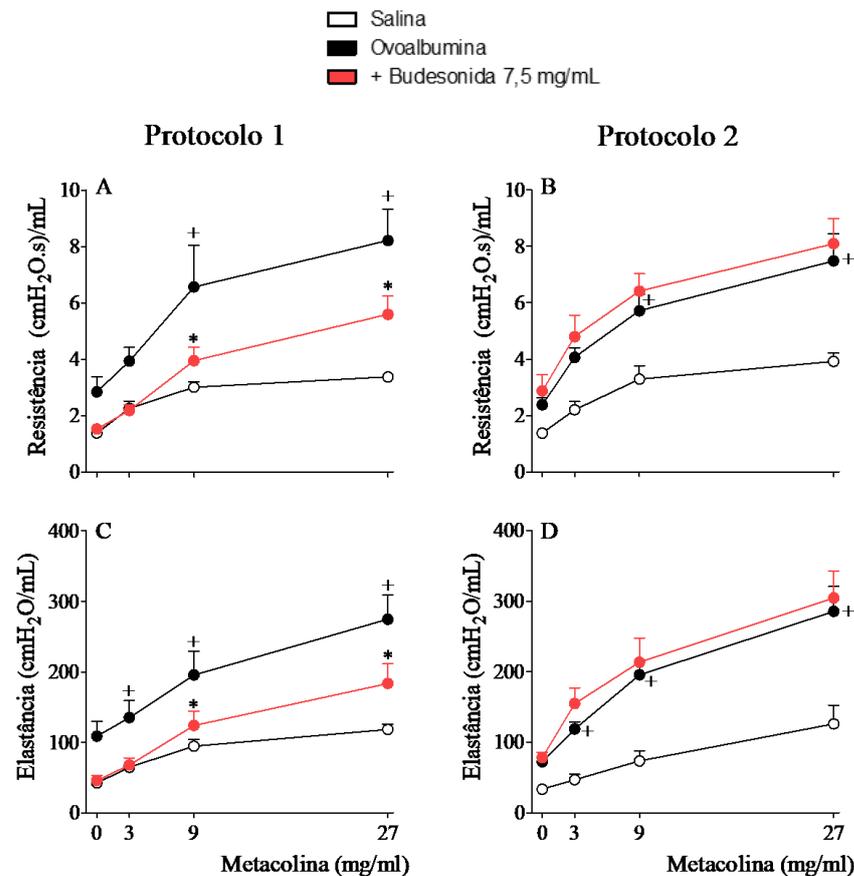
As análises desse estudo foram feitas pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism versão 5.00 para Windows). Os resultados encontrados foram apresentados como média \pm erro padrão, tendo sido submetidos ao teste de análise de variância *Two Way ANOVA* e, posteriormente, ao teste t de *Bonferroni* ou através da utilização do teste *One Way ANOVA*, seguido pelo teste t de *Newman-Keuls Student*. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Efeito do tratamento com budesonida sobre a hiper-responsividade das vias aéreas em modelos de asma grave experimental

Para investigar a função pulmonar e a responsividade à metacolina foi feito um acompanhamento nas mudanças provocadas nos parâmetros de resistência e elastância em camundongos anestesiados, intubados e ventilados mecanicamente. Conforme exposto nas figuras 6A e 6C, houve um aumento nos valores de resistência e elastância frente à aerossolização de concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL) em animais submetidos ao desafio com OVA quando comparados aos seus respectivos controles (salina), indicando um estado de hiper-responsividade das vias aéreas. O tratamento com budesonida reduziu significativamente esse quadro de hiper-reatividade em camundongos A/J sensibilizados e desafiados com o alérgeno por 4 semanas consecutivas (protocolo 1). Entretanto, quando os animais sensibilizados são submetidos a 9 (protocolo 2) (Figuras 6B e 6D) ao invés de 4 provocações semanais consecutivas com OVA eles passam a desenvolver um quadro de refratariedade ao tratamento com budesonida, que não apresenta, portanto, nenhum efeito sobre a redução do quadro de hiper-reatividade. Estes resultados indicam que os camundongos submetidos ao protocolo 1 são notoriamente sensíveis a budesonida, porém na inserção de um número maior de provocações ocorre a evolução de um estado responsivo a esteróides para um estado não responsivo ao tratamento.

Figura 6 – Efeito do tratamento com budesonida sobre a hiper-reatividade das vias aéreas induzidas por OVA em protocolos de asma grave



Protocolo 1 = protocolo de asma sensível ao tratamento com glicocorticoides; Protocolo 2 = protocolo de asma refratária ao tratamento com glicocorticoides. Os animais foram desafiados com salina (○) ou OVA (●) e tratados com budesonida 7,5 mg/mL (●). Os valores representam a média ± EPM (n=7 para cada grupo). +p<0,05 comparado com o grupo controle salina; *p<0,05 comparado com o grupo OVA. Diferenças entre os grupos foram analisadas por *Two Way ANOVA* seguido pelo teste *Bonferroni*. Fonte: O autor (2021).

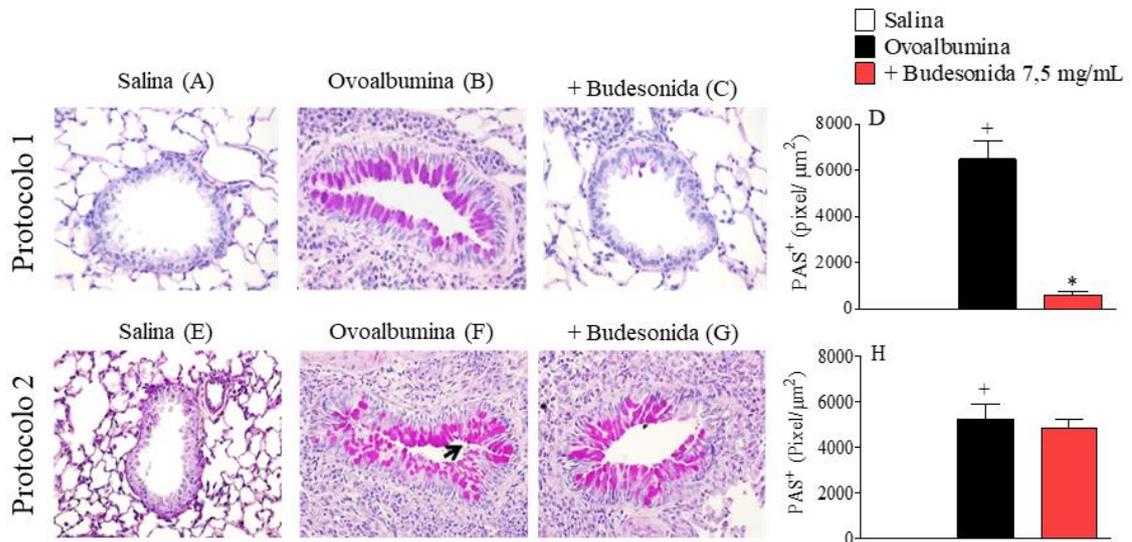
A hiper-responsividade das vias aéreas é uma importante característica fisiopatológica da asma, sendo o estabelecimento desse quadro uma consequência do acúmulo de leucócitos sobre as vias respiratórias, dentre eles os eosinófilos (POSSA *et al.*, 2013). Esses leucócitos, em particular, são conhecidos por serem células efetoras finais do processo inflamatório alérgico, estando, portanto, bastante envolvidos nos importantes eventos da fase crônica da doença, especialmente no remodelamento das vias aéreas (BARRETO *et al.*, 2015). A persistência de quadros de hiper-reatividade está relacionada à ocorrência dessas modificações estruturais, uma vez que alterações constantes acabam desencadeando na presença de vias

aéreas mais espessas, menos flexíveis e mais estreitas, características suficientes para provocação de maior grau de constrição e fechamento das vias aéreas inferiores em resposta a estímulos broncoconstritores (BUSSE, 2010). Em vista disso, é compreensível que a persistência de quadros de AHR se relacione a presença de modificações características no tecido, tanto sobre o componente inflamatório como sobre o do remodelamento.

2.3.2 Efeito do tratamento com budesonida sobre a produção de muco nas vias aéreas em modelos de asma grave experimental

Parte dos aspectos histológicos foram registrados na figura 7, onde se demonstrou por fotomicrografias que pulmões de animais desafiados com OVA (Figura 7B, 7F) apresentaram hipersecreção de muco pelas células caliciformes, sendo sugestivo da ocorrência de hiperplasia e hipertrofia desses componentes celulares existentes no epitélio pulmonar. Essa acentuada produção foi significativa em comparação com o grupo salina (animais saudáveis) (Figura 7A, 7E). Os resultados dessa análise também comprovaram que animais tratados com budesonida no protocolo 1 (Figura 7C) apresentaram importante efeito sobre a redução da produção de muco, e, por essa razão, foram considerados sensíveis a esse tratamento medicamentoso. Entretanto, a longo prazo (protocolo 2) (Figura 7G), a budesonida se demonstrou incapaz de inibir o acúmulo de muco sobre as vias aéreas. Esses mesmos eventos foram também revelados quantitativamente pela análise morfométrica digital, estando adequadamente representados nos gráficos 7D e 7H.

Figura 7 – Efeito do tratamento com budesonida sobre a produção de muco nas vias aéreas



PAS⁺: Coloração com Ácido Periódico de Schiff específica para marcação de muco. As fotomicrografias foram capturadas no aumento de 40x. A análise morfométrica digital foi utilizada para realização da avaliação quantitativa da produção de muco (D, H). Os valores representam a média ± EPM (n=7 para cada grupo). +p<0,05 comparado ao grupo controle salina; *p<0,05 comparado ao grupo OVA. Diferenças entre os grupos foram analisadas por *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. Fonte: O autor (2021).

Para entender como a produção elevada de muco é conduzida na asma alérgica é necessário previamente o conhecimento de que os eosinófilos são importantes células reguladoras do processo de remodelação/reparo. Entre os produtos liberados pela desgranulação dessas células são encontradas importantes proteínas citotóxicas, com destaque para a proteína básica principal (MBP), que causa lise das células epiteliais do trato respiratório inferior (ACHARYA; ACKERMAN, 2014). Como a recuperação plena do epitélio lesado é dada pela restituição dos seus componentes teciduais e essa capacidade de reparo por regeneração é reduzida na asma crônica, ocorre, em razão dessa falha, alguns eventos como a transdiferenciação celular (transição de células Clara para células caliciformes brônquicas) (BRASILEIRO FILHO, 2011; JACOBSEN *et al.*, 2012; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; RAMIREZ *et al.*, 2018).

A persistência da inflamação na mucosa brônquica ocasiona ativação excessiva das vias de reparo, sendo a alteração do epitélio brônquico uma das características do remodelamento tecidual (KEGLOWICH; BORGER, 2015). Como já

documentado em estudos anteriores, o fenótipo remodelado é marcado por alguns eventos, sendo uma característica comum a hiperprodução de muco por células caliciformes que faz aumentar a resposta asmática. Esse acontecimento se deve ao fato de as vias aéreas serem encontradas com obstrução ao fluxo de ar, pois como o muco é produzido excessivamente pelas células caliciformes, ele passa também a ocupar o lúmen das vias aéreas (FAHY; DICKEY, 2010; KAY; PHIPPS; ROBINSON, 2004).

Tomando os resultados de muco, nota-se que a diminuição da deposição desse produto sobre as vias aéreas ocorre para os animais tratados com GC no protocolo 1, sendo sugerido que esse mecanismo de inibição ocorra em razão do êxito das ações anti-inflamatórias do glicocorticoide (TAKAMI *et al.*, 2012). Contudo, o tratamento com o fármaco deixou de gerar efeitos nos animais desafiados por 9 semanas, sendo esse insucesso em eliminar grandes quantidades de muco formado, resultante da incapacidade de se lidar com a inflamação subjacente a remodelação (MELTON, 2002). A remoção prejudicada do muco no trato respiratório é comum aos asmáticos não tratáveis com esteróides, os chamados asmáticos graves, sendo essa condição replicada no protocolo 2 devido a insensibilidade ao tratamento com budesonida.

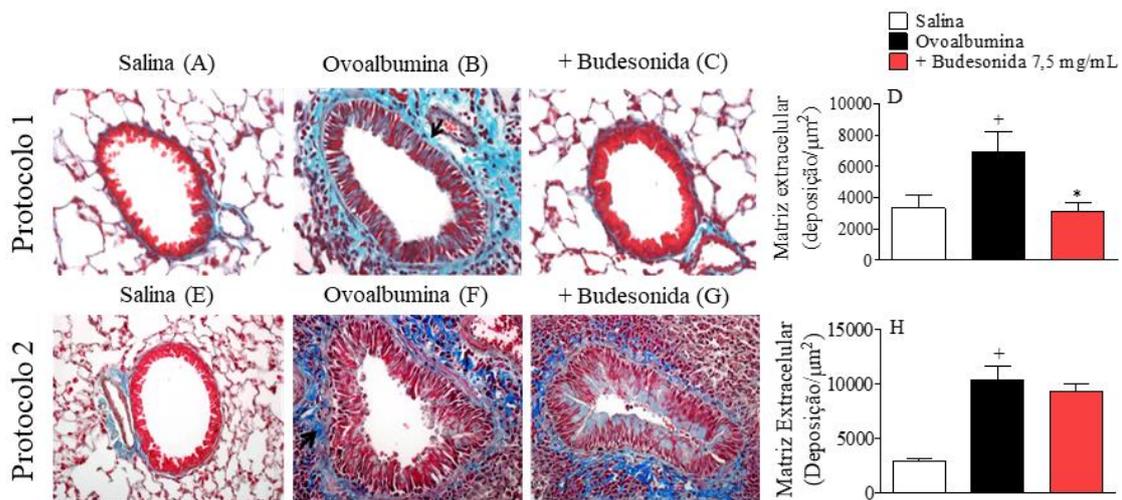
2.3.3 Efeito do tratamento com budesonida sobre fibrose peribronquiolar em modelos de asma grave experimental

Foi mostrado anteriormente que camundongos desafiados com OVA podem apresentar ao longo do tempo alterações persistentes na estrutura das vias aéreas. Nos experimentos desse estudo, o remodelamento foi avaliado através de duas importantes características: hiperprodução de muco, conforme já visto, e deposição de proteínas da MEC produzidas por fibroblastos, e apresentadas a seguir.

Conforme evidenciado nas fotomicrografias representativas da figura 8, verificou-se que os animais sensibilizados e desafiados com OVA possuem na região peribrônquiolar uma vasta deposição de componentes da MEC (Figura 8B, 8F) quando comparados com animais instilados com salina (Figura 8A, 8E). No protocolo 1, o tratamento dos camundongos com budesonida foi capaz de reduzir significativamente o conteúdo de MEC nas vias aéreas, enquanto camundongos do protocolo 2 não responderam ao tratamento com GC, sendo ainda, posto em

destaque, uma acentuada presença de MEC ao redor de suas vias aéreas. A análise morfométrica (Gráfico 8D, 8H) confirmou as observações resultantes da análise histológica apontadas acima.

Figura 8 – Efeito do tratamento com budesonida sobre a deposição de Matriz extracelular



A deposição de componentes de matriz extracelular é marcada através da coloração específica com Tricômico de Gomori. As fotomicrografias foram capturadas no aumento de 40x. A análise morfométrica digital foi utilizada para realização da avaliação quantitativa de fibrose subepitelial (D, H). Os valores representam a média \pm EPM ($n=7$ para cada grupo). $+p<0,05$ comparado ao grupo controle salina; $*p<0,05$ comparado ao grupo OVA. Diferenças entre os grupos foram analisadas por *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. Fonte: O autor (2021).

Os eosinófilos não contribuem com o remodelamento apenas pela secreção de proteínas granulares. Associado a esse infiltrado celular existe ainda a liberação de numerosos mediadores proteicos, particularmente TGF- β 1, considerado um dos mais potentes agentes fibrogênicos (KUWABARA *et al.*, 2018; POSSA *et al.*, 2013). Essas citocinas modulam o processo de fibrose tecidual e apesar de serem secretadas por outros tipos celulares, a principal fonte de TGF- β 1 segue sendo atribuída a presença de eosinófilos (JANULAITYTE *et al.*, 2020).

A deposição anormal de proteínas produzidas da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos sobre a MEC acaba refletindo em rigidez pulmonar, estando, assim, o reparo na asma associado à deposição de tecido conjuntivo (fibroso) e espessamento da membrana basal (KEGLOWICH; BORGER, 2015; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016). Este remodelamento tecidual associado ao aumento de secreção de muco pode estar estreitamente associado à condição de

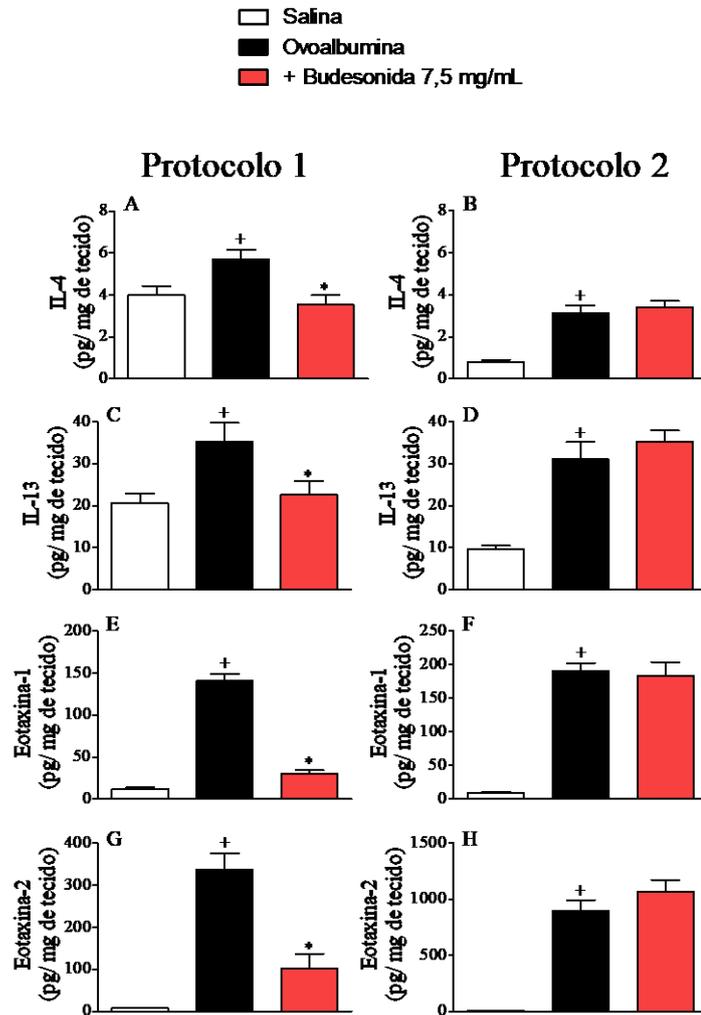
hiper-reatividade brônquica. Os glicocorticoides conseguem reduzir a deposição de proteínas da MEC indiretamente por sua ação anti-inflamatória, suprimindo a população de leucócitos infiltrantes, com destaque para os eosinófilos. Sem o recrutamento dessas células para o sítio da inflamação, conseqüentemente citocinas Th2 efectoras não são liberadas e não retroalimentam esse circuito de dano tecidual (BERAIR; BRIGHTLING, 2014; LAMBRECHT; HAMMAD, 2012).

Resultados conflitantes, entretanto, vêm sendo apresentados por autores. Alguns com redução na espessura da membrana basal e outros não (BERAIR; BRIGHTLING, 2014). Analisando os resultados obtidos da deposição de MEC, observou-se que a administração de budesonida em um protocolo de menor duração (protocolo 1) se mostrou eficiente na redução das proteínas da MEC, porém na apresentação de um protocolo com mais desafios (protocolo 2) o efeito do GC é perdido. Isso provavelmente se relaciona a maior deposição de componentes da MEC e é sugestivo de inibição da degradação da MEC pelas enzimas de remodelação, conhecidas por TIMPs, sendo razoável pensar que possa estar ocorrendo um desbalanço entre TIMPs e MMPs. (MUNITZ; LEVI-SCHAFFER, 2004).

2.3.4 Efeito do tratamento com budesonida sobre os níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no homogenato pulmonar em modelos de asma grave experimental

Estão demonstradas na figura 9 importantes citocinas moduladoras do processo inflamatório existentes na asma, dosadas em amostras de sobrenadantes de homogenato pulmonar. Pode ser observado que camundongos estimulados com OVA apresentaram níveis elevados das citocinas IL-4, IL-13, eotaxina-1 e eotaxina-2 em comparação com os grupos controle desse estudo. Por outro lado, essa resposta imunológica de perfil Th2 despertada no grupo OVA foi reduzida no grupo tratado com budesonida no protocolo de 4 semanas, demonstrando a sensibilidade desses animais ao tratamento com GC. De modo contrário, a administração de budesonida no protocolo de 9 semanas se demonstrou ineficiente em reduzir os níveis de todas as citocinas supracitadas.

Figura 9 – Efeito do tratamento com budesonida sobre os níveis de citocinas no tecido pulmonar



Os valores representam a média \pm EPM ($n=7$ para cada grupo). + $p<0,05$ comparado com o grupo controle salina; * $p<0,05$ comparado com o grupo OVA. Diferenças entre os grupos foram analisadas por *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. Fonte: O autor (2021).

A asma em sua forma mais comum (asma alérgica) é marcada por uma intensa inflamação do tipo 2 nas vias aéreas (WYNN, 2015). Importantes mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos na patogênese da asma de perfil Th2, em destaque as citocinas IL-4 e IL-13, por induzirem o aparecimento de características marcantes da doença. Diversos papéis são desempenhados por essas interleucinas, sendo classicamente conhecidas por estimularem a inflamação alérgica (com aumento na produção de IgE), hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas (com hipersecreção de muco por estimulação de células caliciformes e fibrose subepitelial por ativação de TGF- β) (DAVOINE; LACY, 2014; HALL;

AGRAWAL, 2014; HAMID; TULIC, 2009). Além dessas citocinas, são encontradas no local da inflamação importantes quimioatraentes específicos de eosinófilos, aqui representadas pelas eotaxinas 1 e 2 (FERREIRA, 2015).

A fisiopatologia na resposta alérgica é orquestrada principalmente por citocinas de perfil Th2, que diferente do observado no protocolo 1, após o tratamento com GC continuaram com seus níveis elevados no protocolo 2 (protocolo refratário a glicocorticoide). A falta de bloqueio na produção dessas citocinas nessa condição foi também confirmada indiretamente pela análise de resultados anteriores. A persistência do quadro estabelecido de hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas pode ter relação com os níveis elevados desses mediadores, uma vez que eles estão envolvidos na manutenção da resposta Th2. O fato dos mediadores terem seus níveis regulados negativamente na condição de 4 provocações com alérgeno e estarem elevados no modelo de 9 provocações, sugerem que a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias contribui para a intensificação da resposta inflamatória crônica das vias aéreas e por essa razão poderia estar relacionada ao estado de refratariedade a glicocorticoides observada no protocolo de 9 semanas.

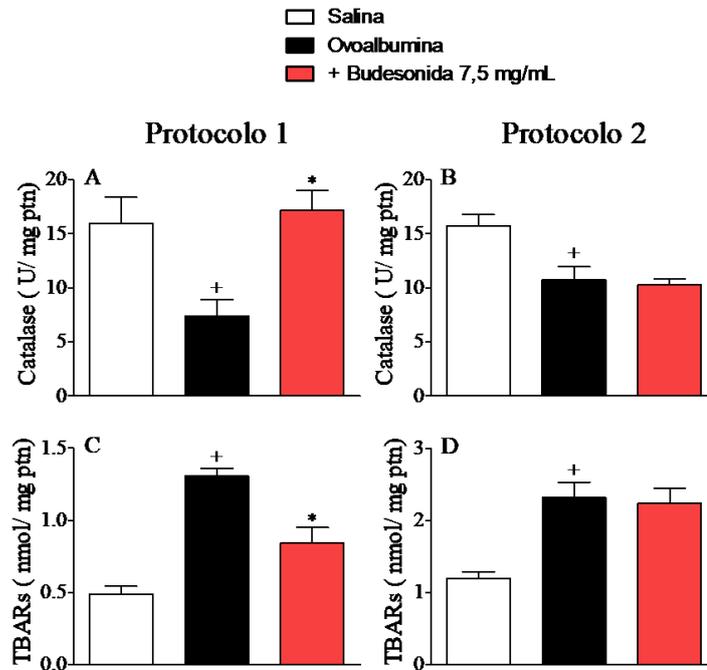
2.3.5 Efeito do tratamento com budesonida sobre a atividade da enzima CAT e dos níveis de MDA em modelos de asma grave experimental

A enzima catalase (CAT) é uma enzima antioxidante cuja função é servir de catalisador para a decomposição de um subproduto tóxico (peróxido de hidrogênio – H_2O_2) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A falha em neutralizar essa espécie reativa de oxigênio (ERO) resulta em peroxidação lipídica, uma das consequências do quadro de estresse oxidativo, e que exhibe como um dos produtos de oxidação o malondialdeído (GOMES, 2013), um biomarcador revelado pelo ensaio de TBARs.

Conforme exibido nas figuras 10A e 10B a atividade da enzima CAT foi reduzida nos grupos desafiados com OVA, o que favoreceu o predomínio da ação oxidante, esta evidenciada com aumento dos níveis do produto de peroxidação lipídica (Figura 10C, 10D). Entretanto, a capacidade antioxidante total do tecido pulmonar foi restaurada pelo emprego de budesonida como tratamento em um protocolo de curta duração (protocolo 1), o que permitiu a redução do biomarcador malondialdeído. Contrariamente ao exposto acima, animais tratados com

budesonida no protocolo 2 não apresentaram redução na produção de MDA, mantendo, desta forma, o quadro de estresse oxidativo.

Figura 10 – Efeito do tratamento com budesonida sobre a atividade da enzima catalase e a produção de malondialdeído



Os valores representam a média \pm EPM (n=7 para cada grupo). ⁺p<0,05 comparado com o grupo controle salina; ^{*}p<0,05 comparado com o grupo OVA. Diferenças entre os grupos foram analisadas por *One-Way* ANOVA seguido pelo teste de *Newman-Keuls*. Fonte: O autor (2021).

Sob condições de estresse, a capacidade de resposta aos glicocorticoides pode ser reduzida. Muito relacionado com a gravidade da doença, o quadro de estresse oxidativo pode ser instalado em decorrência da perda da capacidade antioxidante e/ou da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. A insensibilidade aos corticosteroides deriva-se do estresse oxidativo prolongado, já que esse progresso está associado à diminuição da atividade da CAT (LEWIS, 2021). Estudos anteriores também atribuem à presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio a inflamação mal controlada que evolui para a refratariedade ao tratamento, condição essa que aparenta ter maior relação com a asma grave exemplificada no protocolo 2, tendo em vista que essas espécies reativas não radiculares só estarão em maior nível se houver diminuição da capacidade

antioxidante que, de acordo com o exposto acima, exige maior tempo de patogênese (MERCADO, 2011).

A presença de elevadas concentrações dos biomarcadores de estresse oxidativo e o seu impacto na não responsividade ao fármaco também pode ser confirmada através de resultados já apresentados, pois a presença desses produtos favorece o remodelamento pela provocação de dano epitelial e a persistência do processo inflamatório por induzirem o recrutamento de células inflamatórias. Em concordância com tudo que foi exposto, observamos que os dados obtidos nesse ensaio demonstram perda da sensibilidade ao GC à medida que os desafios vão se estendendo, uma vez que no protocolo 1 (4 desafios com alérgeno) os animais ainda respondem ao tratamento, comprovando a sensibilidade desse protocolo. Entretanto, a resposta ao fármaco se faz ausente no protocolo 2 (9 desafios), o que indica que os animais se tornaram refratários ao tratamento com GC.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados alcançados neste estudo, verificou-se que importantes características fisiopatológicas da asma humana foram desenvolvidas nas vias aéreas de camundongos A/J após exposição crônica a OVA. Em função disso, foi possível atestar a capacidade dos animais A/J em mimetizarem os sinais cardinais da asma, estes representados pela hiper-responsividade, remodelamento e inflamação das vias aéreas.

Dentre os protocolos experimentais apresentados, nossos dados demonstraram que os animais submetidos ao modelo de 9 provocações com alérgeno montaram uma robusta resposta característica de asma grave. Entretanto, a eficácia da budesonida foi constatada no modelo de 4 semanas, porém perdida quando adotado um protocolo de 9 semanas, sinalizando que os camundongos vão se tornando refratários ao tratamento com GC ao longo dos desafios.

Assim, por esse modelo animal ter conseguido mimetizar as principais características da doença encontrada em humanos, concluímos que o protocolo de 9 semanas apresentado no presente estudo surge como uma ferramenta promissora no estudo da asma alérgica. De fato, esses achados contribuirão para estudos futuros, seja através do estudo dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na refratariedade, seja pela triagem de novas alternativas terapêuticas aos anti-inflamatórios esteroidais, adequados para melhor atender esses pacientes de estágios mais graves.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K.R.; ACKERMAN, S.J. Eosinophil granule proteins: form and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406-17415, 2014.
- ADCOCK, I.M.; BARNES, P.J. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. **Chest**, v. 134, p. 394-401, 2008.
- ADCOCK, I.M.; CARAMORI, G.; KIRKHAN, P.A. Strategies for improving the efficacy and therapeutic ratio of glucocorticoids. **Current Opinion in Pharmacology**, v.12, p. 246-251, 2012.
- BARNES, Peter J. Corticosteroid effects on cell signalling. **European Respiratory Journal**, v. 27, p. 413-426, 2006.
- BARNES, Peter J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p.3546-3556, 2008.
- BARNES, Peter J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, p. 76-85, 2010.
- BARNES, Peter J. Glucocorticosteroids: current and future directions. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 29-43, 2011.
- BARNES, Peter J. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.131, n.3, p. 636-645, 2013.
- BARNES, Peter J. Glucocorticosteroids. **Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 93-115, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27796513/>. Acesso em: 24 ago. 2021.
- BARRETO, E. *et al.* Local administration of gold nanoparticles prevents pivotal pathological changes in murine models of atopic asthma. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1038-1050, 2015.
- BERAIR, R.; BRIGHTLING, C.E. Asthma therapy and its effect on airway remodelling. **Drugs**, v. 74, n. 12, p. 1345-1369, 2014.
- BERGERON, C.; TULIC, M.K.; HAMID, Q. Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice. **Canadian Respiratory Journal**, v. 17, n. 4, p. e85-e93, 2010.
- BORTOLOZZO, A.S.S. **O efeito do inibidor de proteinase de origem vegetal CrataBL, sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos Balb/c**. 2015. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo – Patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRITO, T.S. *et al.* Mortalidade por asma no Brasil, 1980-2012: uma perspectiva regional. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 5, p. 354-360, 2018.

BROWN, J.M.; WILSON, T.M.; METCALFE, D.D. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, p. 4-18, 2007.

BRUNTON, L.L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012.

BUC, M. *et al.* Immunopathogenesis of bronchial asthma. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 57, n. 5, p. 331-344, 2009.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUSSE, W.W. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation. **Chest**, v. 138, n. 2, p. 4S-10S, 2010.

CAMPOS, H.S.; CAMARGOS, P.A.M. Broncodilatadores. **Pulmão**, v. 21, n. 2, p. 60-64, 2012.

CARAMORI, G.; PAPI, A. Oxidants and asthma. **Thorax**, v. 59, p. 170-173, 2004.

CARSON, F.L.; MARTIN, J.H.; LYNN, J.A. Formalin Fixation for Electron Microscopy: a re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 3, p. 365–373, 1973.

CHO, Y.S.; MOON, H-B. The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 2, n. 3, p. 183-187, jul. 2010.

CHUNG, K.F. *et al.* International ERS/ ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. **European Respiratory Journal**, v. 43, p. 343-373, 2014.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 129, p. 4-10, 2002.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Asma. Distrito Federal, Brasília: **Conitec**, 2021. Disponível em: <http://conitec.gov.br/decisoes-sobre-incorporacoes>. Acesso em: 10 set. 2021.

COMHAIR, S.A.; ERZURUM, S.C. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 1, p. 93-124, jan. 2010.

CRUZ-TOPETE, D.; CIDLOWSKI, J.A. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of Glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 20-32, 2015

DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 570, 2014.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. **Informações de Saúde, Epidemiológicas e Morbidade**. DATASUS, 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 421-431, 1990.

DURHAM, A.L.; WIEGMAN, C.; ADCOCK, I.M. Epigenetics of asthma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 1103-1109, 2011.

FAHY, J.V.; DICKEY, B.F. Airway mucus function and dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 23, p. 2233-2247, 2010.

FELTON, J.M. *et al.* Eosinophils in the lung – modulating apoptosis and efferocytosis in airway inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 302, p. 1-11, jul. 2014.

FERREIRA, K.B.O. **Mecanismos de secreção de eosinófilos murinos em resposta à estímulos inflamatórios e à asma experimental**. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

GALLI, S.J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693-704, 2012.

GIRODET, P.O. *et al.* Airway remodeling in asthma: New mechanisms and potential for pharmacological intervention. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, p. 325-337, 2011.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA:Global strategy for asthma management and prevention. **GINA**, 2021. Disponível em: www.ginasthma.org. Acesso em: 05 ago. 2021.

GLOBAL ASTHMA NETWORK. The Global Asthma Report 2018. Auckland, New Zealand: **GAN**, 2018. Disponível: <http://globalasthmareport.org/>. Acesso em: 05 ago. 2021.

GOMES, T.D.U.H. **Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs* em camundongos**. 2013. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

GRAMMATIKOS, A.P. The genetic and environmental basis of atopic diseases. **Annals of Medicine**, v. 40, n. 7, p. 482-495, 2008.

HALL, S.; AGRAWAL, D.K. Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, v. 23, p. 316-329, 2014.

HAMID, Q.; TULIC, M. Immunobiology of asthma. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 489-507, 2009.

HENDERSON, I. *et al.* Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? **Pharmacological Research**, v. 160, n. 105189, 2020.

HIROTA, N.; MARTIN, J.G. Mechanisms of airway remodeling. **Chest**, v. 144, n.3, p. 1026-1032, 2013.

HOLGATE, Stephen T. *et al.* Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 15025, p.1-22, 2015.

HOLGATE, Stephen T. Pathogenesis of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 38, n. 6, p. 872-897, 2008.

HOYMANN, H.G. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.55, n.1, p.16-26, 2007.

INGAWALE, D.K.; MANDLIK, S.K.; PATEL, S.S. An emphasis on molecular mechanisms of anti-inflammatory effects and glucocorticoid resistance. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2015.

JACOBSEN, E. A. *et al.* The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. **Blood**, v. 120, n.19, p. 3882–3890, 2012.

JANULAITYTE, I. *et al.* In vivo allergen-activated eosinophils promote collagen I and fibronectin gene expression in airway smooth muscle cells via TGF- β 1 signaling pathway in asthma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1837, p. 1-19, 2020.

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, 2004.

KEENAN, C.R. *et al.* Glucocorticoid-resistant asthma and novel anti-inflammatory drugs. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 17-18, p. 1031–1038, 2012.

KEGLOWICH, L.F.; BORGER, P. The three a's in asthma – airway smooth muscle, airway remodeling & angiogenesis. **The Open Respiratory Medicine Journal**, v. 9, p. 70-80, 2015.

KER, J.; HARTERT; T.V. The atopic march: what's the evidence? **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 103, n. 4, p. 282-289, 2009.

KIM, H.Y.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Innate lymphoid cells in asthma: Will they take your breath away? **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 795-806, 2016.

KOMI, D.E.A.; WÖHRL, S.; BIELORY, L. Mast cell biology at molecular level: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31828527/>. Acesso em: 10 set. 2021.

KUBO, M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. **Immunological Reviews**, v. 278, p. 162-172, 2017.

KUDO, M.; ISHIGATSUBO, Y.; AOKI, I. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 263, p. 1-16, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran – Patologia – Bases patológicas das doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2016.

KUWABARA, Y. *et al.* Role of matrix metalloproteinase-2 in eosinophil-mediated airway remodeling. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2163, 2018.

LAGO, V.C.; VALE, S.A.; GODOY, I. Sim, asmáticos graves existem. A importância e as limitações dos dados de centros especializados. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 3, p. 1-2, 2020.

LAMBRECHT, B.N.; HAMMAD, H. The airway epithelium in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 684-692, 2012.

LEVENTHAL, S.M. *et al.* Uncovering a multitude of human glucocorticoid receptor variants: an expansive survey of a single gene. **BMC Genetics**, v. 20, n. 16, 2019.

LEWIS, B.W. *et al.* Oxidative stress promotes corticosteroids insensitivity in asthma and COPD. **Antioxidants(Basel)**, v.10, n.9, 2021.

MACHADO, P. **Mecanismos envolvidos na contração da musculatura lisa traqueobrônquica na asma**. 2012. 46 f. Monografia (Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MELTON, L. Does mucus hypersecretion matter in airway disease? **The Lancet**, v. 359, n. 9321, p. 1924, 2002.

MERCADO, N. *et al.* Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of phosphoinositide-3-kinase- δ . **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 2, p. 465-470, 2011.

MICHALIK, M. *et al.* Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 21, p. 3943-3961, 2018.

MUNITZ, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Eosinophils: “new” roles for “old” cells. **Allergy**, v. 59, n. 3, p. 268-275, 2004.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. Asthma: diagnosis, monitoring and chronic asthma management. **NICE**, 2017. Disponível em: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng80>. Acesso em: 01 set. 2021.

NEWCOMB, D.C.; PEEBLES JR, R.S. Th17-mediated inflammation in asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 755-760, 2013.

NICOLAIDES, N. *et al.* Recent advances in the molecular mechanisms causing primary generalized glucocorticoid resistance. **Hormones**, v. 15, n. 1, p. 23-24, 2016.

OAKLEY, RH.; CIDLOWSKI, JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033-1044, 2013.

O'BYRNE, P.M. GAUVREAU, G.M.; BRANNAN, J.D. Provoked models of asthma: what have we learnt? **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 181-192, 2009.

PIZZICHINI, M.M.M. *et al.* Recomendações para o manejo da asma da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia – 2020. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 1-16, 2020.

POSSA, S.S. *et al.* Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 46, 2013.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v.533, p. 222-239, 2006.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J.A. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. **Endocrine Development**, v. 24, p. 41-56, 2013.

RAMIREZ, G.A. *et al.* Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. **BioMed Research International**, p. 1-28, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5829361/>. Acesso em: 14 jan. 2022.

RAMOS-RAMÍREZ, P.; TLIBA, O. Glucocorticoid receptor β (GR β): beyond its dominant-negative function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3649, 2021

ROGERS, L.K.; CISMOWSKI, M.J. Oxidative stress in the lung – The Essential Paradox. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 37-43, 2018.

SAHINER, U.M. *et al.* Oxidative stress in asthma. **World Allergy Organization Journal**, v. 4, n. 10, p. 151-158, 2011.

SCHESCHOWITSCH, K.; LEITE, J.A.; ASSREUY, J. New insights in glucocorticoid receptor signaling-more than just a ligand-binding receptor. **Frontiers in Endocrinology**, v.8, n. 16, 2017.

SUGIURA, H. *et al.* Nitrate stress in refractory asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2, p. 355-360, 2008.

TAKAMI, S. *et al.* Glucocorticoids inhibit MUC5AC production induced by transforming growth factor- α in human respiratory cells. **Allergology International**, v. 61, n. 3, p. 451-459, 2012.

TANG, M.L.K. *et al.* Airway remodelling in asthma: Current understanding and implications for future therapies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 474-488, 2006.

TATTERSFIELD, A.E. *et al.* Asthma. **The Lancet**, v. 360, p. 1313-1322, 2002.

TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAU, J.; LIBERT, C. A general introduction to glucocorticoid biology. **Frontiers in Immunology**, v.10, n. 1545, 2019.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed Editora SA, 2012.

TREVOR, J.L.; DESHANE, J.S. Refractory asthma: mechanisms, targets, and therapy. **Allergy**, v. 69, p. 817-827, 2014.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; LIBERT, C. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 4, p. 671-693, 2014.

VITELLIUS, G.; LOMBES, M. Genetics in endocrinology: glucocorticoid resistance syndrome. **European Journal of Endocrinology**, v. 182, n. 2, p. R15-R27, 2020.

VUOLO, F.S. **Efeitos do canabidiol em um modelo murino de asma alérgica foco na inflamação e no processo de remodelamento**. 2016. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2016.

WENZEL, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716-725, 2012.

WILLIAMS, D.M. Clinical pharmacology of corticosteroids. **Respiratory Care**, v.63, n. 6, p. 655-670, 2018.

WYNN, T.A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 271-282, 2015.