

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISA EM IMUNOPATOLOGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA
CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

Akinori Cardozo Nagato

**A HIPERÓXIA PROMOVE A POLARIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA
INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS INDUZIDA POR OVALBUMINA,
DIRECIONADA PARA O FENÓTIPO DE CÉLULAS Th17**

AKINORI CARDOZO NAGATO

**A HIPERÓXIA PROMOVE A POLARIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA
INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS INDUZIDA POR OVALBUMINA,
DIRECIONADA PARA O FENÓTIPO DE CÉLULAS Th17**

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup

Coorientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nagato, Akinori Cardozo.

A hiperóxia promove a polarização da resposta imune na inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina, direcionada para o fenótipo de células Th17. / Akinori Cardozo Nagato. -- 2016.

69 f. : il.

Orientador: Fernando Monteiro Aarestrup

Coorientador: Frank Silva Bezerra

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2016.

1. Hiperóxia. 2. Inflamação das vias aéreas. 3. Resposta imune. 4. camundongos BALB C. I. Aarestrup, Fernando Monteiro, orient. II. Bezerra, Frank Silva, coorient. III. Título.

AKINORI CARDOZO NAGATO

**A HIPERÓXIA PROMOVE A POLARIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA
INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS INDUZIDA POR OVALBUMINA,
DIRECIONADA PARA O FENÓTIPO DE CÉLULAS Th17**

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

Aprovada em ____ de _____ de 2016, pela Banca Examinadora composta por:

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

Prof. Frank Silva Bezerra (Coorientador)
Doutor – UFOP

Prof. Deoclécio Alves Chianca Junior
Doutor – UFOP

Prof. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto
Doutor – UERJ

Prof^a. Carla Malaguti
Doutora – UFJF

Prof^a. Beatriz Julião Vieira Aarestrup
Doutora – UFJF

Dedico este trabalho à minha mãe Lúcia Helena Cardozo Nagato, por toda abnegação; e por amparar meus passos com pequenos gestos que reluzem esperança.

AGRADECIMENTOS

Em forma de agradecimento deixo aqui registrada uma singela lembrança de como fui guiado pelo grande amigo Prof. Frank Silva Bezerra até a UFJF, e cordialmente acolhido no Centro de Biologia da Reprodução (CBR), em dezembro de 2009, pelo Prof. Fernando M. Aarestrup e Prof^a. Beatriz Julião Vieira Aarestrup, aos quais tenho intensa admiração e gratidão incomensurável. Hoje tenho a oportunidade de formalmente agradecer-los pelas orientações que extrapolaram o âmbito acadêmico, e se direcionaram à minha melhor formação enquanto ser humano. No CBR senti-me igualmente acolhido pela Prof^a. Vera Peters e Prof^a. Martha Guerra. Agradeço pela oportunidade de ter o CBR como ambiente de aprendizado. Aos olhos de cada professor e amigos de trabalho pude lapidar não apenas o conhecimento científico, mas os métodos mais empíricos da convivência humana. Agradeço extensivamente aos amigos: Marcella Terra (UFJF), Laetitia Alves Cinsa (UFJF), Lorena Ribeiro Silva (UFJF), Jessica Correa Bezerra (UFJF), Paulo Ulisses Matola (UFJF), Julieta Maria de Almeida (UFJF), Prof. André Talvani (UFOP), Leonara Beatriz Fayer de Almeida (UFJF), Ana Carla Balthar Bandeira (UFOP), Keila Karine Campos (UFOP), Thais Lourenço Martins (UFOP) Tulio Versiani (UFOP), Carolina de Lourdes Julião Vieira (UFJF), Maria Inês da Cruz Campos (UFJF), Flávia Mello Monteiro (UFJF), Harleson Lopes de Mesquita (UFJF), Marco Aurélio dos Santos Silva (UERJ) e Eduardo Tavares Lima Trajano (USS). Obrigado a todos!

Agradeço em especial,

A doce Marcela S. de Lacerda Nagato,
ao meu amigo e amor Henri de Lacerda Nagato e à adorável Lis de Lacerda
Nagato, pela saudade manifestada por cada um de vocês quando minha ausência
física se desfazia ao retornar para casa.

“Para cada esforço disciplinado há uma retribuição múltipla.”
*(Jim Rohn)*¹

¹HUNTER, James C; O Monge e o Executivo: uma história sobre a essência da liderança. Editora Sextante, Rio de Janeiro. 2004.

NAGATO, A.C. A hiperóxia promove a polarização da resposta imune na inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina, direcionada para o fenótipo de células Th17. Juiz de Fora (MG), 2016. 59f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Saúde – Doutorado em Saúde Brasileira) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora.

RESUMO

Estudos prévios têm demonstrado que o dano e estresse oxidativo induzido pela hiperóxia levam ao aumento de interleucina-6 (IL6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e fator de crescimento transformador beta (TGF β) em pulmões de camundongos. Juntos, a IL6 e TGF β têm sido conhecidos por direcionar a diferenciação do fenótipo para as células T-helper 17 (Th17). No estudo corrente nós testamos a hipótese que a hiperóxia promove a polarização de células T para o fenótipo Th17 na resposta inflamatória aguda das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA). A inflamação das vias aéreas foi induzida em camundongos BALB/c, fêmeas, através da sensibilização intraperitoneal e instilação intranasal de OVA, acompanhado de metacolina (MetCo). Depois do ataque com MetCo, os animais foram expostos a condições de hiperóxia em uma câmara de inalação durante 24h. Os animais do grupo controle permaneceram em normóxia ou receberam hidróxido de alumínio em salina tamponada. Depois de 24h de hiperóxia, o número de macrófagos (M ϕ) e linfócitos diminuiu nos animais com inflamação induzida por OVA, enquanto o número de neutrófilos (PMN) aumentou. Os resultados mostraram que a expressão de Fator de transcrição nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), Fator de transcrição Tbet (Tbet) e interleucina-17 (IL17) aumentou depois de 24h de hiperóxia tanto em M ϕ alveolares quanto em células epiteliais pulmonares, comparados com os animais que permaneceram em ar ambiente e com inflamação induzido por OVA. A hiperóxia, isoladamente, levou ao aumento dos níveis de Fator de necrose tumoral (TNF α) e Quimiocina ligante CC5 (CCL5), enquanto a hiperóxia depois da inflamação por OVA levou a diminuição dos níveis de CCL2. O extravasamento de células inflamatórias peribronquiolar e perivascular foi observado após a inflamação pulmonar e hiperóxia. A hiperóxia promoveu a polarização da resposta imune em direção ao fenótipo Th17, resultando em estresse oxidativo e dano tecidual, e migração de PMN e M ϕ para os pulmões e vias aéreas. Esses achados sugerem que controlar o estresse oxidativo induzido pela hiperóxia pode contribuir importantemente no controle da inflamação aguda das vias aéreas induzida por OVA.

Palavras-chave: hiperóxia, inflamação das vias aéreas, resposta imune, camundongos BALB C.

NAGATO, A.C. **Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH₁₇ cell phenotype.** Juiz de Fora (MG), 2016. 59f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Saúde – Doutorado em Saúde Brasileira) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that hyperoxia-induced stress and oxidative damage to the lungs of mice lead to an increase in IL6, TNF α and TGF β expression. Together, IL6 and TGF β have been known to direct T cell differentiation towards the TH₁₇ phenotype. In the current study, we tested the hypothesis that hyperoxia promotes the polarization of T cells to the TH₁₇ cell phenotype in response to ovalbumin-induced acute airway inflammation. Airway inflammation was induced in female BALB/c mice by intraperitoneal sensitization and intranasal introduction of ovalbumin, followed by challenge methacholine. After the methacholine challenge, animals were exposed to hyperoxic conditions in an inhalation chamber for 24 h. The controls were subjected to normoxia or aluminum hydroxide dissolved in phosphate buffered saline. After 24 h of hyperoxia, the number of macrophages and lymphocytes decreased in animals with ovalbumin-induced airway inflammation, whereas the number of neutrophils increased after ovalbumin-induced airway inflammation. The results showed that expression of Nrf2, iNOS, Tbet and IL17 increased after 24 of hyperoxia in both alveolar macrophages and in lung epithelial cells, compared with both animals that remained in room air, and animals with ovalbumin-induced airway inflammation. Hyperoxia alone without the induction of airway inflammation lead to increased levels of TNF α and CCL5, whereas hyperoxia after inflammation lead to decreased CCL2 levels. Histological evidence of extravasation of inflammatory cells into the perivascular and peribronchial regions of the lungs was observed after pulmonary inflammation and hyperoxia. Hyperoxia promotes polarization of the immune response towards the TH₁₇ phenotype, resulting in tissue damage associated with oxidative stress, and the migration of neutrophils to the lung and airways. Elucidating the effect of hyperoxia-induced oxidative stress is relevant to preventing or treating ovalbumin-induced acute airway inflammation.

Keywords: hyperoxia, airway inflammation, immune response, BALB C mice

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Mapa do mundo da prevalência da asma clínica.
- Figura 2 Geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila a partir do oxigênio molecular.
- Figura 3 O “*up-regulation*” das enzimas antioxidantes durante a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio mediado pelo fator de transcrição nuclear derivado de eritróide 2
- Figura 4 Processo de sensibilização ao antígeno específico (Allergen).
- Figura 5 Resposta imune asmática à exposição ao antígeno, após processo de sensibilização.
- Figura 6 Polarização de células Th1 e Th2 na asma.
- Figura 7 Linha do tempo experimental da inflamação aguda das vias aéreas induzida por ovalbumina e hiperóxia em modelo de camundongos BALB/c de 06 a 08 semanas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
BAL	Lavado broncoalveolar
CAT	Enzima catalase
CCL11	Quimiocina ligante CC11
CCL17	Quimiocina ligante CC17
CCL2 (MCP1)	Quimiocina ligante CC2
CCL5 (RANTES)	Quimiocina ligante CC5
CCR3	Receptor 3 de quimiocina CC
CCR4	Receptor 4 de quimiocina CC
CH ₃ OH	Formaldeído 37 40%
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GATA3	Fator de transcrição GATA3
GINA	Iniciativa global para asma
HE	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO	Radical hidroxila
IFN γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina-E
IL1 β	Interleucina 1 β
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL6	Interleucina 6
IL9	Interleucina 9
IL13	Interleucina 13
IL17	Interleucina 17
IL17A	Interleucina 17A
IL17F	Interleucina 17F
IL21	Interleucina 21
IL22	Interleucina 22

IL26	Interleucina 26
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
MAPK	Proteína quinase de ativação mitogênica
MDA	Malondialdeído
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Na dibásico anidro
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de Na monobásico
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Fator de transcrição nuclear derivado de eritróide 2
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
ONOO ⁻	Peróxido nitrito
OVA	Ovalbumina
PAHO	Organização Pan Americana de Saúde
PBS	Tampão Fosfato
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
STAT4	Fator de transcrição STAT4
Tbet	Fator de transcrição Tbet
TGFβ1	Fator de crescimento de transformação β1
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
Th17	Linfócitos T helper 17
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
Asma como problema de saúde pública	21
Oxigenação em crises agudas de asma	23
Aspectos gerais sobre a hiperóxia	24
Aspectos gerais sobre o estresse oxidativo	25
Modelos animais no estudo da fisiopatologia da asma	29
O padrão de resposta imunológica na asma	30
Evidências que reforçam a hipótese de que a relação hiperóxia/asma pode modificar o padrão de resposta imunológica	35
3 HIPÓTESE	37
4 OBJETIVOS	38
Objetivo geral	38
Objetivos específicos	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
Animais de experimentação	40
Condições de criação e manejo dos animais	40
Grupos experimentais	41
Modelo de inflamação aguda das vias aéreas (modelo de asma experimental) através da sensibilização por ovalbumina (OVA) em camundongos fêmeas BALB/c	42
Sensibilização com OVA intraperitoneal (IP) e/ou injeção de PBS diluído em Al(OH) ₃	42
Instilação intranasal com OVA ou PBS	42
Nebulização com metacolina ou PBS	43
Modelo de exposição ao O ₂	43
Análise de células do lavado broncoalveolar (BAL) e eutanásia	43
Remoção dos pulmões	44
Homogeneizado pulmonar	45
Análises de estresse e dano oxidativo	45

Mensuração das quimiocinas TNF α , CCL2 e CCL5 por <i>ELISA</i>	45
Preparação dos pulmões para histopatologia	46
Análise histopatológica, histomorfométricas e estereológica das vias aéreas	47
Análise histopatológica.....	48
Análise histomorfométrica e histoestereológica	48
Imuno-histoquímica	49
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÕES	52
APENDICE A.....	63
APENDICE B.....	64
APENDICE C	65
APENDICE C	66
ANEXO A –APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	67
ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA I.....	68
ANEXO C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA II.....	69
ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA III.....	70
ANEXO E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA IV.....	71

1 INTRODUÇÃO

Os modelos experimentais de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina² são classicamente conhecidos como “modelos experimentais de asma”, por “recriar” nas vias aéreas de cobaias os eventos complexos fisiopatológicos observados também na inflamação por asma em seres humanos. Esses modelos, sobretudo, são importantes porque, uma vez simulado o microambiente inflamatório da asma, permite estudar os fatores (e neste caso o oxigênio medicinal) que possivelmente venham interferir no curso da inflamação.

A palavra asma é um termo derivado da palavra grega e significa chiado em inglês. As primeiras evidências da utilização deste termo foram observadas no livro *Ilíada* de Homero (passagens 14 e 15, na mitologia grega).

“Na primeira passagem, *Hector* luta contra o gigante *Ajax*, arremessando uma lança sem qualquer efeito. *Ajax*, o gigante, em resposta ao ataque, atira no peito de *Hector* uma enorme pedra, abaixo do pescoço. *Hector* entra em colapso. Neste momento é descrito: “*ho d' argaleoi echet' asthmati haim' emeon*”. O que significa: “foi dominado pela asma, vomitando sangue”. Na segunda passagem, o termo asma aparece quando o autor se refere à recuperação de *Hector*, quando cessaram: “*asthma kai hidros*” e “*asthma and sweating*.” (Saunders, 1993, p. 647).

A partir de “*Hippocratic corpus*” (Latin: *corpus hippocraticum* – coleção de escritos médicos escritos por Hipócrates), o termo asma passou a se aproximar da sua definição atual, incorporando os conceitos relacionados aos sintomas clínicos descritos até hoje. A asma já significava, naquela época: “dificuldade respiratória acelerada” ou “respiração curta” (Saunders, 1993).

² A ovalbumina é um peptídeo frequentemente utilizado nos estudos sobre resposta imunológica alérgica, como a asma, porque é capaz de se ligar ao epítipo do complexo maior de histocompatibilidade MHC classe II.

Até a década de 60 a asma foi incluída no rol das demais doenças obstrutivas das vias aéreas, principalmente pelas características semelhantes relacionadas à obstrução das vias aéreas (conhecida como *Hipótese Holandesa*). Entretanto, nesta mesma época, outra hipótese (conhecida como *Hipótese Britânica*) desvinculava a asma das demais doenças obstrutivas das vias aéreas, pois os aprofundamentos dos conhecimentos sobre os mecanismos imunológicos de disparo da inflamação das vias aéreas tratava a asma como uma nova entidade distinta das demais Doenças Pulmonares Obstrutivas Crônicas (DPOC) (Barnes, 2008).

Hoje, por consenso (Reddel, Bateman *et al.*, 2015) (Becker, Lemiere *et al.*, 2006); (Lemiere, Bai *et al.*, 2004); (Boulet, Becker *et al.* 1999), a asma é definida como uma doença caracterizada por sintomas persistentes ou paradoxais, como dispneia, “aperto no peito”, chiado, produção de secreção e tosse, associado com limitação variável do fluxo aéreo e hiper-responsividade à estímulos endógenos e exógenos, onde a inflamação das vias aéreas é primeiramente a principal marca.

Os mecanismos fisiopatológicos de disparo da inflamação na asma ainda são considerados complexos porque há a participação de diferentes células inflamatórias, que produzem uma variedade (que serão descritos a seguir) de mediadores inflamatórios, agindo de forma complexa sobre as células alvo das vias aéreas, induzindo respostas fisiopatológicas por vezes anormais (Barnes, 1996). Para compreender como estes processos imunológicos determinam o processo inflamatório das vias aéreas na asma é necessário estudar os mecanismos patogénéticos, identificando não apenas os fatores que disparam, mas aqueles que intensificam e modulam essa resposta inflamatória (Busse and Lemanske 2001). Diferentes mecanismos imunológicos que iniciam o processo de inflamação na asma são conhecidos, entretanto apenas os mecanismos que envolvem sensibilização

inicial (contato prévio com o antígeno) e a resposta secundária inflamatória (condição que ajuda a explicar a hipersensibilidade alérgica³) serão abordados neste momento.

Dentre seus vários tipos, a asma alérgica[#] é a variedade mais comum, atingindo cerca de 60% dos adultos acometidos, e 90% das crianças acometidas (Kaplan, 2005), estando inclusive, entre as desordens alérgicas mais prevalentes dos países desenvolvidos (Galli, Tsai *et al.*, 2008)

Os inúmeros estudos que ainda buscam esclarecer os mecanismos fisiopatológicos da asma justificam-se por ainda haver alta prevalência e taxa de mortalidade desta doença. Além disso, porque se trata de uma doença que acomete tanto adultos, crianças, adolescentes e idosos (Reddel, Bateman *et al.*, 2015) (Luna Mde, Almeida *et al.*, 2011) (Wehrmeister, Menezes *et al.*, 2012). Isto está relacionado, sobretudo, ao elevado número de internações (Fiori, Goncalves *et al.*, 2012).

A gravidade da exacerbação da asma está relacionada, principalmente, à obstrução das vias aéreas, cujo resultado é a hipoxemia, que é revertida com a utilização de broncodilatadores, pressões positivas contínuas nas vias aéreas (Lafond, Series *et al.*, 2007) e oferta suprafisiológica da concentração de oxigênio (O₂) (Rancourt, Keng *et al.*, 2001) (Zaher, Miller *et al.*, 2007).

O manejo da asma no mundo é consensual. Entretanto, há poucos esclarecimentos sobre a utilização da oxigenoterapia durante a asma (National

³ A ideia de que indivíduos fazem reatividade ou reações de hipersensibilidade a algumas substâncias exógenas (*no self*) ao organismo (o que norteia o conceito atual de alergia) foi enunciada pela primeira vez em 1906 por Clemens von Pirquet. (Galli *et al.*, 2008) Embora seus primeiros relatos tenham sido embasados nas observações das doenças relacionadas ao soro, isto teve um impacto importante sobre as desordens alérgicas, incluindo a asma alérgica, porque essas desordens também estão associadas com a produção aumentada de imunoglobulina E (IgE), e com a expansão de alérgenos específicos mediados por populações de células T – mecanismos semelhantemente observados na fisiopatologia da inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina e que serão elucidados mais detalhadamente a seguir durante a revisão de literatura.

Asthma e Prevention, 2007), e ainda há resultados duvidosos sobre os reais benefícios da utilização do O₂ em altas concentrações para os indivíduos asmáticos (Rodrigo, Rodriguez Verde *et al.*, 2003); (Chien, Ciuffo *et al.*, 2000).

Especificamente no Brasil, a utilização do O₂ medicinal durante as internações ou emergência dos indivíduos asmáticos é pouco criteriosa. Sobretudo no que diz respeito à prescrição do tempo em que os pacientes devem permanecer em oxigenoterapia depois de reverter a hipoxemia; se observado o algoritmo para o tratamento da crise asmática do adulto nos prontos-socorros, previsto nas Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. 2006), a orientação é ofertar um fluxo de O₂ de pelo menos três litros por minuto quando não é possível analisar a saturação arterial parcial de O₂.

Estas últimas considerações tornam-se ainda mais relevantes se considerarmos que o O₂ medicinal ofertado em concentrações suprafisiológica é tóxico para o organismo (Brueckl, Kaestle *et al.*, 2006), induzindo o “*start*” para o estresse oxidativo e inflamação pulmonar (detalhado a seguir).

Não há evidências publicadas sobre os efeitos da exposição ao O₂ em concentrações suprafisiológicas sobre a resposta inflamatória imunológica na asma. Se a hiperóxia é capaz de induzir o estresse oxidativo, aumentando nos pulmões a concentração das espécies reativas de O₂ e nitrogênio, e se tem sido mencionado inclusive que resposta inflamatória é modulada também pela presença destes radicais livres (Fattman, Schaefer *et al.*, 2003).

No presente estudo investigamos se há envolvimento do estresse oxidativo induzido pela exposição ao O₂ medicinal em relação à resposta inflamatória imunológica em modelo experimental de asma, em camundongos BALB/C com inflamação aguda das vias aéreas e pulmonar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Asma como problema de saúde pública

Segundo a *Global Initiative for Asthma* (GINA), a asma é a maior causa de morbidade crônica que leva a morte no mundo, e há evidências de que a prevalência desta morbidade tem aumentado nos últimos 20 anos. Estima-se que em 2025 haverá cerca de 400 milhões de pessoas no mundo com asma (Reddel, Bateman *et al.*, 2015) (Bousquet e Busse, 2010).

O documento publicado pela GINA aponta que, o Brasil está entre os países com maior prevalência de asma clínica no mundo (com cerca de 11.4% da população) (Figura 1), ainda que não esteja entre os países com maior taxa de casos de mortalidade por asma no mundo, apresentando cerca de 1.8 casos de morte por 100.000 asmáticos. Esta realidade foi diferente na década de 90, aonde o Brasil chegou a apresentar uma taxa de mortalidade por asma dez vezes maior comparado aos países desenvolvidos (Cooper, Rodrigues *et al.*, 2009).

Ainda que existam evidências de que a taxa de mortalidade tenha reduzido no Brasil, o impacto econômico e social com as internações ainda é elevado. Evidências que reforçam essas informações posicionam a asma como um importante problema de saúde pública (Sole, Camelo-Nunes *et al.*, 2014); (Wehrmeister, Menezes *et al.*, 2012). Em 2009, por exemplo, segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), o Brasil chegou a possuir em torno de 15 milhões de indivíduos afetados pela asma, dos quais cerca de 350.000 resultaram em admissões hospitalares (Fiori, Goncalves *et al.*, 2012).

Este tipo de internação em 1996 resultou em gastos que giraram em torno de 76 milhões de reais, e em 2006 cerca de 96 milhões de reais (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006).

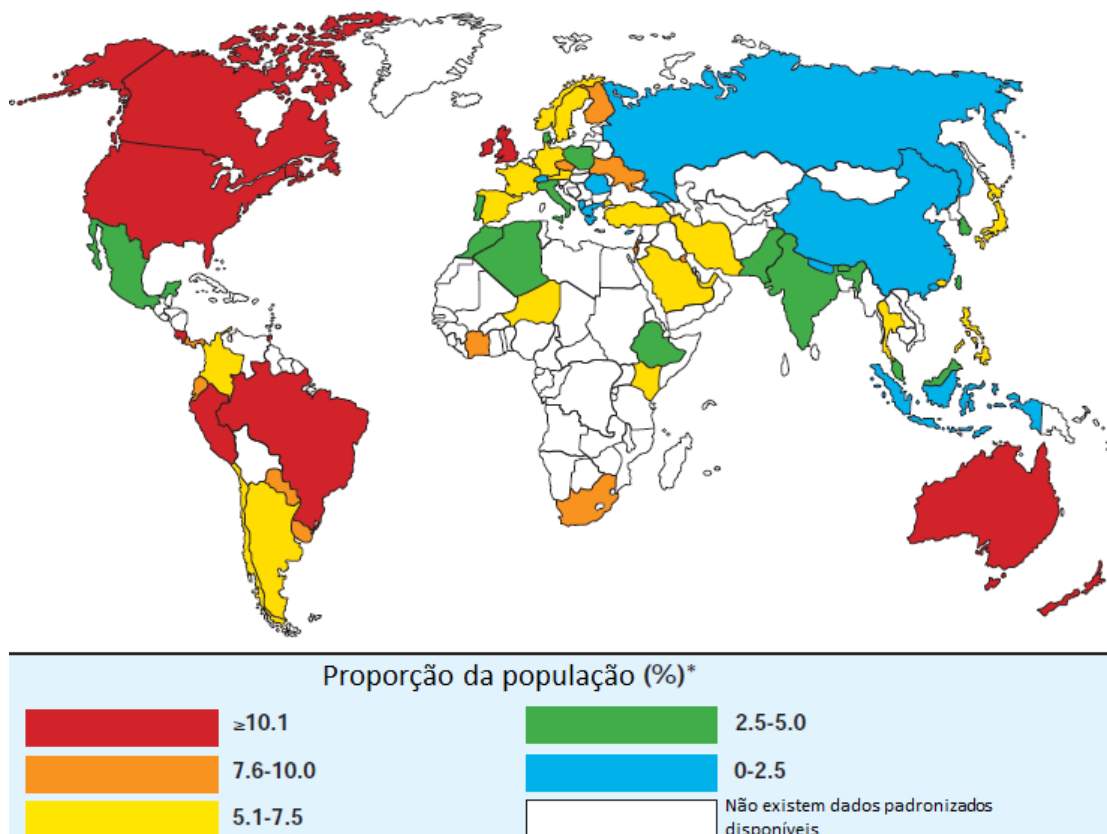


Figura 1 – Mapa do mundo da prevalência da asma clínica. Adaptado de (Cooper, Rodrigues *et al.*, 2009)

Além disso, tem sido frequentemente reportado na literatura que além de acometer os adultos (Macedo, Menezes *et al.*, 2007), há um impacto importante da asma sobre crianças e adolescentes brasileiros (Sole, Camelo-Nunes *et al.*, 2014); (Luna Mde, Almeida *et al.*, 2011) (Wehrmeister, Menezes *et al.*, 2012) (Casagrande, Pastorino *et al.*, 2008); (Chatkin e Menezes, 2005) (Amorim e Daneluzzi, 2001). Inclusive, há evidências de que a alta prevalência de asma tem sido associada ao estilo de vida ocidental, e fatores ambientais, tais como exposição microbiana, infecções durante a infância, e a

poluição atmosférica (Pearce e Douwes, 2006). Este último ponto, não se limitando apenas aos brasileiros (Anderson, Butland et al. 2012).

Oxigenação em crises agudas de asma

Segundo o *National Heart Lung and Blood Institute National Asthma Education and Prevention Program* (2007), a suplementação de O₂ é recomendada com o intuito de reverter a hipoxemia durante a exacerbação moderada e severa da asma. Embora esta prática seja comum em pacientes com asma aguda (O'driscoll, Howard *et al.*, 2011), há controvérsia sobre a utilização do O₂ em altas concentrações para os pacientes asmáticos em crises agudas.

Dois importantes estudos clínicos demonstraram, por exemplo, que a administração de 100% de O₂ para pacientes asmáticos induziu hipercapnia (Rodrigo, Rodriguez Verde *et al.*, 2003); (Chien, Ciuffo *et al.*, 2000). Um terceiro relatou que a hipoxemia refratária a utilização da suplementação de O₂ está relacionada ao aparecimento de pneumonias em pacientes asmáticos (Rodrigo, Rodrigo *et al.*, 2004).

Ainda que tóxico, o uso do O₂ como primeira escolha para reverter a hipoxemia na asma é observado em diferentes publicações. No *European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers* (Boe, Dennis *et al.*, 2001), o O₂ em ambientes hospitalares deve ser o gás de escolha na condução para os casos de asma aguda, comparado a utilização do ar comprimido, mesmo para os pacientes estáveis (Boe, Dennis *et al.*, 2001). A suplementação com O₂ como primeiro passo para tratar os pacientes com asma severa aguda é confirmado por outro autor (Inwald, Roland *et al.*, 2001).

(Tokuda e Miyagi, 2001) sugerem, inclusive, que o O₂ deva ser administrado precocemente, ainda em ambiente domiciliar. Acredita-se, sobretudo, que esta estratégia seja mais eficaz quando comparado aos benefícios da suplementação do O₂ em ambiente hospitalar. Seja porque os benefícios clínicos da suplementação com O₂ não tem sido associada à plena reversão da hipoxemia, seja porque classicamente sabe-se que o O₂ suplementado entre 50-100% é potencialmente tóxico (Jackson, 1985).

Aspectos gerais sobre a hiperóxia

Desde que foi descoberto, em 1770 por *Scheele* e *Priestley*, o O₂ tem sido o mais eficaz, amplamente disponível e barato agente terapêutico (Brueckl, Kaestle *et al.*, 2006). Embora a suplementação suprafisiológica de O₂, ou hiperóxia (Petrache, Choi *et al.*, 1999), seja necessária para manter a oxigenação do tecido periférico, paradoxalmente, a exposição à alta concentração de O₂ causa dano pulmonar (Morse, Otterbein *et al.*, 2003). Isto é caracterizado pelo dano às células epiteliais alveolares e endoteliais, presença de edema alveolar, extravasamento de proteínas e influxo de macrófagos e neutrófilos para o espaço alveolar (Pepperl, Dorger *et al.*, 2001). Atualmente, sabe-se que a toxicidade do O₂ está relacionada à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (radicais livres) (Brueckl, Kaestle *et al.*, 2006) e à indução do dano oxidativo (Valenca Sdos, Kloss *et al.*, 2007); (Popovic, Gerschman *et al.*, 1964).

Aspectos gerais sobre o estresse oxidativo

As espécies reativas são conhecidas por atacar as biomoléculas, causando dano tecidual, por meio da peroxidação lipídica, oxidação de proteína e dano ao DNA (Narasaraju, Jin *et al.*, 2003). As espécies reativas de O₂ (ROS) e nitrogênio (RNS), como: ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (HO⁻) e peróxido nitrito (ONOO⁻), agem também como importantes mediadores na patogênese da inflamação hiperóxica, e como contribuidoras da lesão pulmonar aguda (Perkowski, Scherpereel *et al.*, 2006); (Wang, Feinstein *et al.*, 2004); (Cho, Jedlicka *et al.*, 2002) (Tsan, Tacy *et al.*, 1997).

Macrófagos e neutrófilos são importantes fontes de O₂⁻, um produto da redução do O₂ (Mccord e Fridovich, 1969). Nos mamíferos, por exemplo, estão envolvidos na sua produção: cofatores, enzimas e organelas citoplasmáticas (Freeman e Crapo, 1981). Entretanto, foi demonstrado que a mais importante via para síntese de O₂⁻ é dependente da enzima NADPH oxidase, através da ativação intracelular das MAPK (Parinandi, Kleinberg *et al.*, 2003).

O O₂⁻ apresenta um importante papel no desequilíbrio redox, porque ele é precursor de outras espécies reativas (Turrens, 2003). Ele pode reagir, por exemplo, com óxido nítrico (NO⁻), e produzir ONOO⁻, uma RNS altamente oxidante (Fattman, Schaefer *et al.*, 2003). Por outro lado, na dismutação do O₂⁻ pela enzima superóxido dismutase (SOD), são gerados até duas vezes mais H₂O₂ comparado à cadeia respiratória, importante fonte de ROS. O H₂O₂ pode ser totalmente reduzido à água (mediada pela Catalase) ou, na presença de metais de transição, ser parcialmente reduzido à radical hidroxila

(OH⁻), uma das mais importantes espécies reativas, cujo potencial de redução é alto e o tempo de vida curto (Giorgio, Trinei *et al.*, 2007) (D'autreaux e Toledano, 2007).

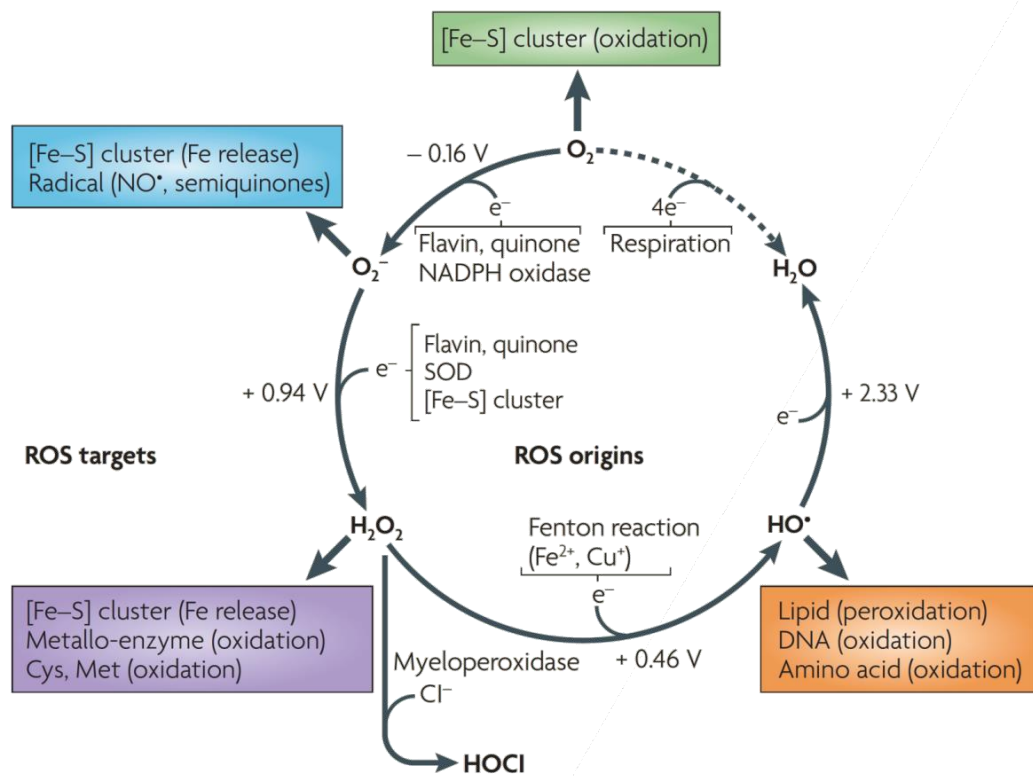


Figura 2 – Geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila a partir do oxigênio molecular. Representação da ação das enzimas antioxidantes (por exemplo: SOD e Mieloperoxidase). Adaptado de (D'autreaux e Toledano, 2007)

Como não são conhecidos “scavengers” para o OH⁻, para evitar o ataque às biomoléculas, enzimas antioxidantes controlam as concentrações, por exemplo, de seus precursores (O_2^- e H_2O_2) visando manter o equilíbrio do sistema oxido-redução (Laloi, Apel *et al.*, 2004). Colaboram neste processo de detoxificação celular, por exemplo: antioxidantes enzimáticos, como: superóxido dismutase; catalase; sistema glutatona que são ativados por fatores de transcrição nucleares. O “*up-regulation*” destas enzimas antioxidantes durante a hiperóxia, por exemplo, é mediado pelo fator de

transcrição nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) (Cho, Jedlicka *et al.*, 2002). Esses eventos mantêm o balanço entre as funções fisiológicas e o dano pulmonar através da taxa relativa de formação e remoção das ROS e RNS (Comhair, Thomassen *et al.*, 2000).

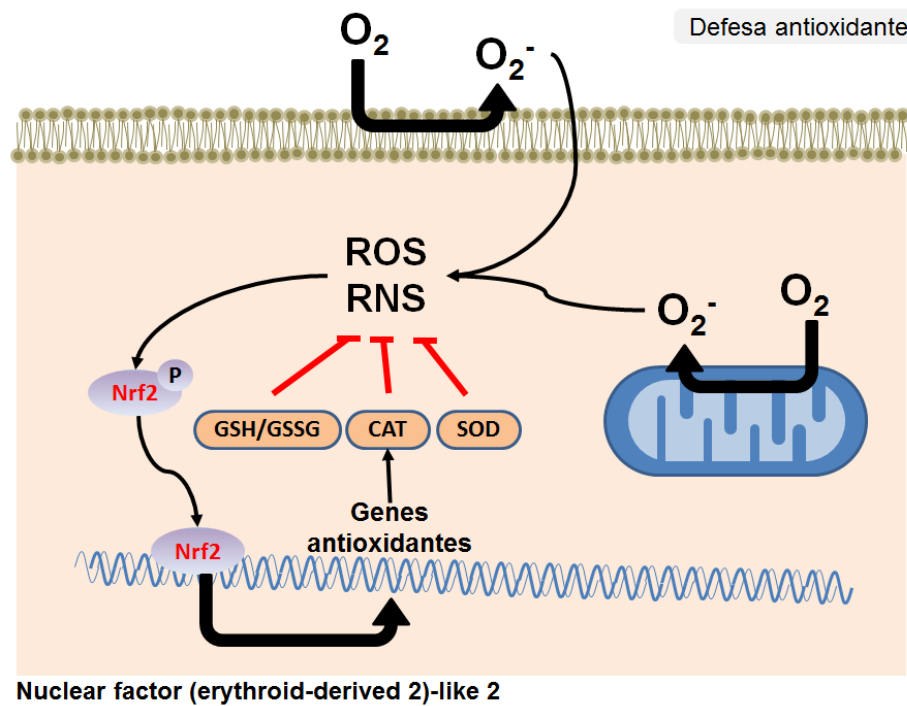


Figura 3 – O “up-regulation” das enzimas antioxidantes (catalse – CAT; superóxido dismutase – SOD e glutatona reduzida/glutatona oxidada – GSH/GSSH) durante a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) mediado pelo fator de transcrição nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2)

Em condições fisiológicas, a remoção do excesso de oxigênio molecular, que evita a formação em excesso de ânion superóxido, também pode ocorrer mediante conversão do O_2 em óxido nítrico (NO) através das isoformas da enzima óxido nítrico sintase, óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) (Hussain, Hofseth *et al.*, 2003). Entretanto, em condições de estresse oxidativo, induzido tanto pela inflamação na asma (Bowler e Crapo, 2002) ou hiperóxia (Quan, Zheng *et al.*, 2011), um excesso de NO é gerado nas vias aéreas por aumento da atividade da enzima óxido

nítrico sintase induzida (iNOS), a partir da utilização do aminoácido L-arginina e O₂ (Comhair e Erzurum, 2002). Este fenômeno eleva, inclusive, a formação de ONOO⁻, principalmente na membrana interna mitocondrial, a partir da enzima óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS), acentuando o dano oxidativo (Van Den Berghe, 2004).

Especificamente na asma, os eosinófilos são as maiores (Macpherson, Comhair *et al.*, 2001) e mais importantes fontes de iNOS (Bowler e Crapo, 2002). Inclusive o óxido nítrico exalado tem sido utilizado como diagnóstico e controle da asma (Carvalho, Rodrigues Da Silva *et al.*, 2015).

Modelos experimentais têm estudado a patogênese da lesão pulmonar hiperóxica investigando as respostas celulares durante a inflamação (Ward, Waxman *et al.*, 2000) e a instalação das alterações morfológicas (Kohno, Ishizaka *et al.*, 2004) e funcionais pulmonares (Desai, Sinclair *et al.*, 2007). Já foi demonstrado, inclusive, que durante o estresse oxidativo induzido pela hiperóxia, mesmo em condições normobáricas, por exemplo, a toxicidade do oxigênio é mediada pela iNOS e geração de ONOO⁻ (Demchenko, Atochin *et al.*, 2008). Esses achados foram também observados em roedores (Quan, Zheng *et al.*, 2011).

Nós demonstramos os efeitos da exposição ao O₂ em doses diferentes de hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. Em um primeiro estudo, após 90 min de exposição, a hiperoxia induziu o dano oxidativo do parênquima pulmonar dos ratos, aumentou a presença de células inflamatórias, e induziu o extravasamento de eritrócitos e o edema (Valença, 2007). Em um segundo estudo demonstramos que os ratos Wistar expostos a 50% ou 75% de O₂, após 90 min, não exibiu alterações no pulmão, enquanto que a 100% de

oxigênio, durante o mesmo tempo de exposição, foi observado edema e dano oxidativo, com aumento de malondialdeído – produto da peroxidação lipídica (Nagato, Silva *et al.*, 2009). Posteriormente, investigamos os períodos de estresse, inflamação e dano oxidativo tecidual após a hiperóxia em pulmões de camundongos BALB/c - estirpe sensível a hiperoxia, que desenvolve em pouco tempo inflamação pulmonar induzida pelo O₂ (Ho, 2002; Whitehea, 2006). Neste estudo mantivemos os animais em hiperoxia por 12, 24 e 48 horas. Demonstramos ao final de 24 horas de hiperóxia que houve um importante influxo de monomorfonucleares para a luz alveolar, e uma maior expressão no parênquima pulmonar de fator de necrose tumoral (TNF α), e maior expressão de interleucina-6 (IL6) no homogeneizado deste mesmo órgão (Nagato, Bezerra *et al.*, 2012).

Modelos animais no estudo da fisiopatologia da asma

A fisiopatologia da asma tem sido frequentemente estudada em modelos experimentais que utilizam animais (Gueders, Paulissen *et al.*, 2009) (Shin, Takeda *et al.*, 2009). Isto porque os estudos com seres humanos são limitados, primeiramente, por questões éticas, principalmente quando há a necessidade de realização de procedimentos invasivos, ou não se tem conhecimento prévio da eficácia e toxicidade *in vivo* do objeto de estudo. A utilização de camundongos também é justificada porque essas espécies se reproduzem facilmente em laboratório, atingem a idade adulta rapidamente, apresentam baixo custo relacionado aos cuidados e alojamento, há uma ampla disponibilidade de reagentes para marcadores da resposta imune (Gualdi L.P., Pereira A.C., *et al.*, 2010). Sobretudo, porque os modelos

murinos, especificamente camundongos da linhagem BALB/c, desenvolvem semelhantemente aos humanos: inflamação pulmonar - com aumento de mastócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, a hipersecreção de muco, a hiper-responsividade das vias aéreas (com aumento da resistência nas vias aéreas), aumento da produção de IgE específica (em modelo de exposição com ovalbumina) e aumento da expressão de citocinas, como IL4, IL5, IL13 (Gueders, Paulissen *et al.*, 2009).

Além desses fatores, na experimentação animal há maior controle sobre variáveis intervenientes que atualmente são descritas como determinantes e afetam diretamente o fenótipo da asma, tais como: a dieta, e principalmente fatores ambientais relacionados à higiene. O controle do ambiente experimental aumenta a probabilidade de um microbioma comum, minimizando a interferência sobre a resposta imunológica de infecções prévias dos animais relacionadas ao meio ambiente (Edwards, Bartlett *et al.*, 2012).

O padrão de resposta imunológica na asma

Classicamente, tanto em humanos quanto em murinos, no processo fisiopatológico da asma alérgica há o aumento no número de células TCD4+ nas vias aéreas, com predominância de células *T helper 2* (Th2). Essa resposta inflamatória ocorre secundariamente à exposição do organismo ao antígeno específico - processo conhecido como “*sensibilização*” (Figura 2).

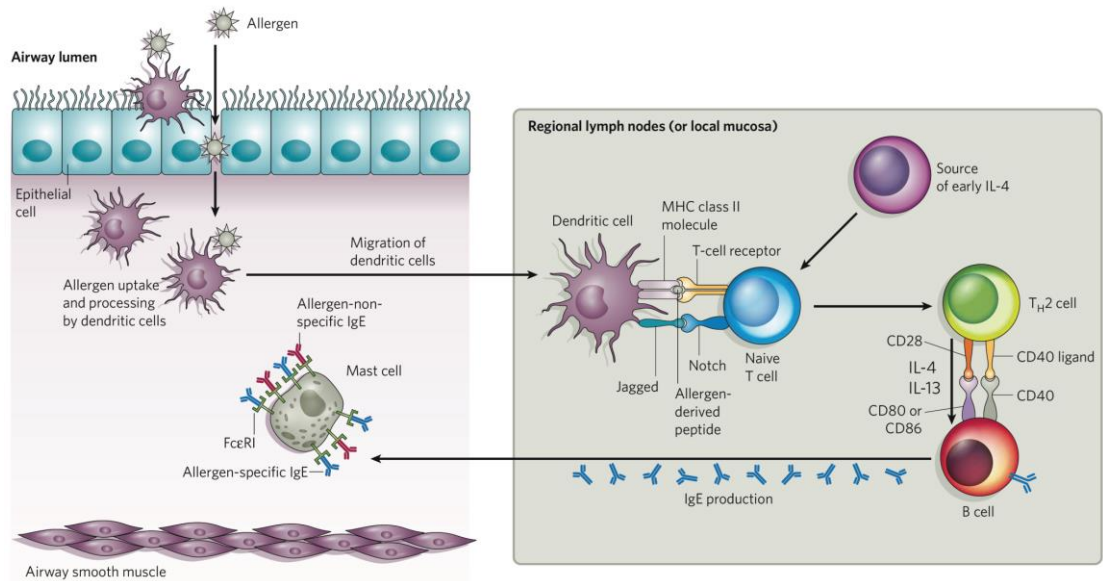


Figura 4 – Processo de sensibilização ao antígeno específico (Allergen). Células dendríticas reconhecendo o antígeno, migrando para os linfonodos regionais e apresentando o antígeno às Células T virgens, induzindo a ativação de Células Th2 e Células B. Células B está secretando IgE específica para o plasma. E observa-se um mastócito com IgE específico, com ligante de alta afinidade (FceRI). Adaptado de (Galli, Tsai *et al.*, 2008)

Depois de sensibilizado, a resposta imune secundária é montada e caracterizada pelo repertório de interleucinas (IL) liberadas por estas células (IL4, IL5, IL9 e IL13) (Galli, Tsai *et al.*, 2008), e, também, pelo infiltrado de mastócitos, eosinófilos, e macrófagos para as vias aéreas (Figura 3).

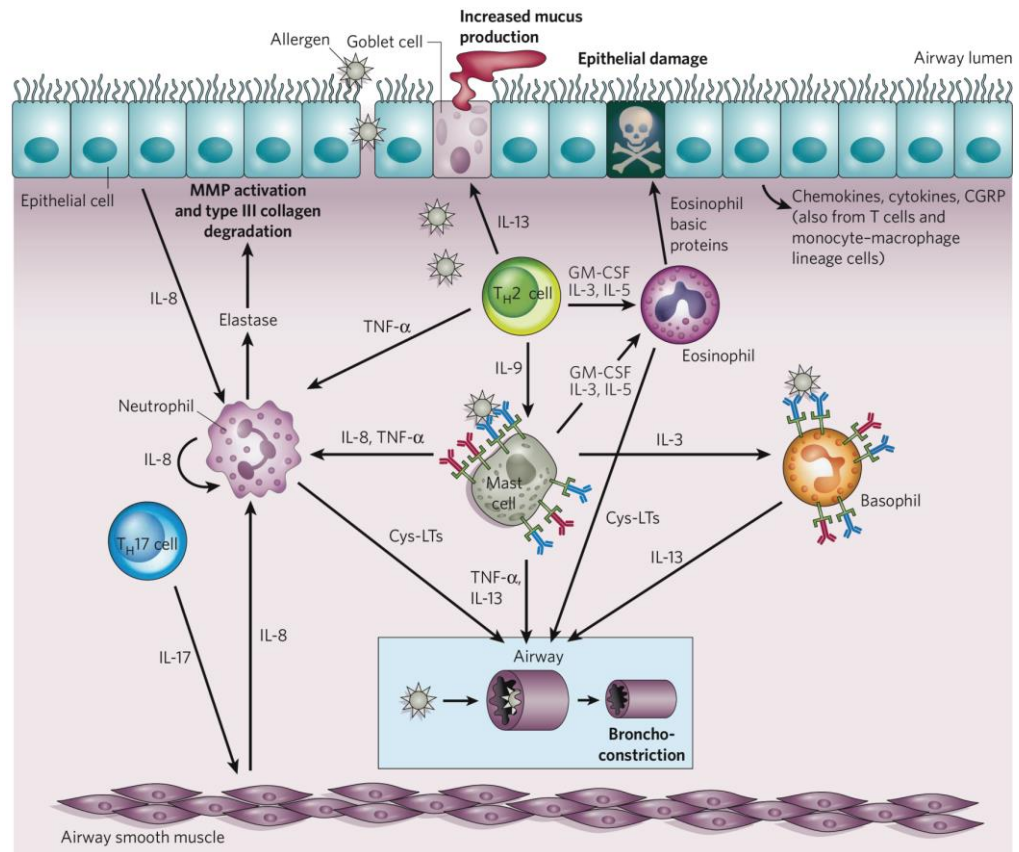


Figura 5 – Resposta imune asmática à exposição ao antígeno, após processo de sensibilização. Células Th2 e Mastócitos participando da ativação de eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células caliciformes. À esquerda Células Th17 induzindo a broncoconstricção. Adaptado de (Galli, Tsai *et al.*, 2008)

Neste processo, os antígenos inalados ativam três importantes mecanismos: (1) mastócitos sensibilizados através de receptor de IgE induzem a liberação de mediadores que estimulam a broncoconstricção, incluindo: leucotrienos cisteínicos (C4, D4, E4), prostaglandina D2 (Abraham e St John 2010); (2) as células epiteliais liberam Fator de Células-Tronco (SCF) que promovem a manutenção dos mastócitos na mucosa da superfície das vias aéreas (Barnes, 2008); (3) as células dendríticas mielóides processam os alérgenos (condicionados por Linfopoiatina Estromal Tímica (TSLP), oriundo tanto das células epiteliais quanto de mastócitos), e liberam quimiocina ligante CC-17 (CCL17) e CCL22, que actua sobre o Receptor 4 de

quimiocina CC (CCR4), atraindo células Th2 para as vias aéreas (Holt, Strickland *et al.*, 2008).

As células Th2 passam então a ter papel central durante a inflamação contra o patógeno extracelular, orquestrando a resposta inflamatória mediada por suas interleucinas padrão. A IL9 estimula a proliferação de mastócitos. As IL4 e IL13 estimulam as células B a sintetizar IgE. Enquanto a IL5, citocina também induzida pelas células epiteliais (através de CCL11) via CCR3, estimula o recrutamento eosinofílico (Galli, Tsai *et al.*, 2008).

O deslocamento do padrão de resposta Th2 na inflamação está relacionado ao fator transcricional GATA3, aumentado na asma por indução de IL4. O fator transcricional GATA3 inibe a STAT4, que deixa de ativar o fator de transcrição Tbet, reduzindo o recrutamento de células Th1 (Vercelli, 2008).

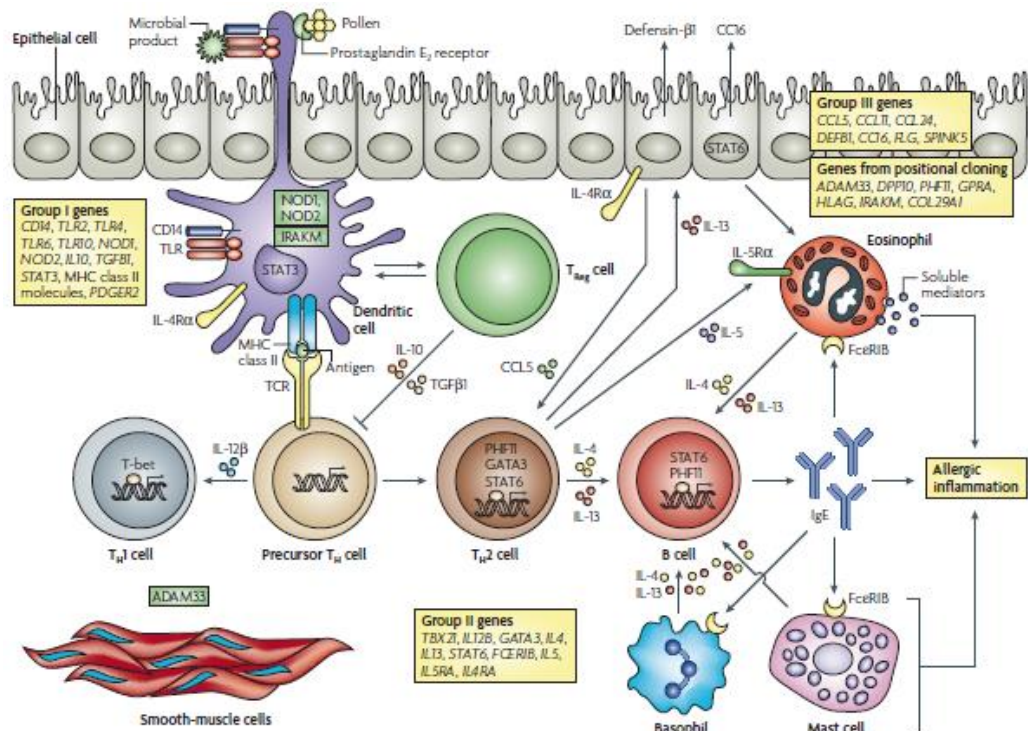


Figura 6 – Polarização de células Th1 e Th2 na asma. O fator de transcrição Tbet direcionando padrão para resposta Th1 e GATA3 para Th2. Adaptado de (Vercelli, 2008)

Mesmo assim, há evidência de que na asma severa há a presença de células Th1 – que tipicamente são conhecidas por produzir interferon- γ (IFN γ) na resposta imune contra patógenos intracelular como: bactérias, fungos, e vírus (Mosmann e Coffman, 1989). Ainda que recentemente tenha sido evidenciado o envolvimento do IFN γ com a hiperresponsividade das vias aéreas na asma (Yao, Lu *et al.*, 2012), a real participação dessas células no processo fisiopatológico da asma, e a relação delas com as células Th2 ainda são controversas (Vock, Hauber *et al.*, 2010).

Embora seja conhecido que as citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 ajam potencialmente como um *feedback* para amplificar a diferenciação das células T em células Th1 e Th2, desde que estes conceitos foram introduzidos por Mosmann e Coffman (1989), o paradigma Th1/Th2 ainda não foi totalmente esclarecido na fisiopatologia da asma. Sabe-se, pelo menos, que quando há o deslocamento para resposta imune Th1 (mediada por IL2 e IFN γ), o *downregulation* das células Th2 é induzido pelo aumento de Tbet que suprime GATA3 (Barnes, 2008).

Esse paradigma Th1/Th2 foi ainda ampliado após a descoberta de um terceiro subconjunto de células T *helper*, as células Th17 (células da população TCD4), que produzem IL17 e apresentam funções efetoras distintas de células Th1 e Th2. A principal função destas células parece ser a eliminação de patógenos que não são adequadamente tratados por células Th1 ou Th2. No entanto, as células Th17 têm sido mencionadas como potentes indutoras de inflamação do tecido, associadas com a patogênese de muitas doenças auto-imunes e experimentais (Korn, Bettelli *et al.*, 2009).

Inclusive, tem sido mencionada a participação dessas células e também das células Th17/Th2 na patogênese da asma severa (Vock, Hauber *et al.*, 2010). O papel da IL17 no processo de imunorregulação das doenças pulmonares ainda é pouco conhecido (Shi, Jin *et al.*, 2012); (Holt, Strickland *et al.*, 2008).

As células Th17 são células que também produzem mediadores inflamatórios bem conhecidos, como: TNF α , IL1 β , e IL6, e citocinas relativamente recém-descobertas, como: IL17A, IL17F, IL22, IL21 e IL26 (Zhu, Yamane *et al.*, 2010). Sabe-se que a diferenciação, amplificação e manutenção das células T virgens em Th17 são mais eficientes quando TGF β , IL21 e IL6 estão disponíveis.

Evidências que reforçam a hipótese de que a relação hiperóxia/asma pode modificar o padrão de resposta imunológica

A hipótese, no entanto, de que a hiperóxia modifica a resposta inflamatória imune em modelo murino experimental de asma é reforçada por evidências complementares, tais como: (1) a hiperóxia induz o aumento nos pulmões de: IL6, TNF α (Nagato, Bezerra *et al.*, 2012), e IFN γ (Bhandari e Elias, 2006), que são citocinas comumente observadas na resposta Th1, e não Th2 como observa-se classicamente na resposta dos pulmões à asma; depois porque (2) durante a hiperóxia há o aumento de TGF β 1 (Li, Choo-Wing *et al.*, 2011), citocina que modula, conjuntamente com a IL6, a diferenciação das células T virgem em células Th17; e (3) a hiperóxia induz o estresse oxidativo (Nagato, Silva *et al.*, 2009), evento que, inclusive, é observado na asma severa (Barnes, 2008).

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

Estudos experimentais como o que foi sugerido neste estudo, que buscam elucidar os efeitos da hiperóxia sobre os fatores modulatórios do processo fisiopatológico da asma, podem beneficiar os asmáticos, porque, ainda que a inflamação das vias aéreas seja um fator determinante da asma, a inflamação quase nunca é mensurada e a consistência do processo inflamatório quase nunca é confirmada (Wenzel, 2012).

3 HIPÓTESE

Nossa hipótese era que o estresse oxidativo induzido pela hiperóxia pudesse modificar o padrão de resposta imune após a inflamação aguda das vias aéreas em modelo experimental de asma.

4 OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar se a hiperóxia é capaz de modificar o padrão de resposta imune de células T na inflamação aguda das vias aéreas em modelo experimental de asma.

Objetivos específicos

- Avaliar se a hiperóxia é capaz de alterar a densidade de número de células mononucleares e polimorfonucleares peribronquiolares, em lâmina própria e na luz alveolar dos camundongos BALB/c no modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina;
- Avaliar os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α), quimiocinas CCL2 (MCP-1) e CCL5 (RANTES) no homogeneizado pulmonar de camundongos BALB/c no modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina seguida ou não de hiperóxia;
- Avaliar a capacidade de modificação da atividade da enzima catalase (CAT), devido à hiperóxia, no homogeneizado pulmonar de camundongos BALB/c no modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina;
- Avaliar a capacidade da hiperóxia em modificar a concentração de malondialdeído (MDA) no homogeneizado pulmonar de camundongos BALB/c no modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina;
- Avaliar a possibilidade da hiperóxia em modificar a expressão de Nrf2, Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), Tbet, e IL17 no tecido pulmonar de

camundongos BALB/c no modelo de inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina;

- Investigar se a hiperóxia é capaz de modificar o padrão de resposta imune na inflamação aguda das vias aéreas induzindo resposta Th1 e Th17.
- Avaliar se a hiperóxia associada à asma é capaz de alterar a densidade de volume de parênquima pulmonar;

5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo analítico experimental foi realizado em parceria entre as Universidades Federais de Juiz de Fora (UFJF) e Ouro Preto (UFOP), ambas do Estado de Minas Gerais, e foi aprovado pela Comissão de Ética para o uso de animais experimentais da UFOP (OFÍCIO CEUA N°. 107/2012, de 10 de outubro de 2012) (ANEXO 1). A primeira etapa foi realizada na UFOP (indução do modelo de inflamação aguda das vias aéreas induzida por ovalbumina -modelo experimental de asma aguda, exposição à hiperóxia e coleta das amostras, análises bioquímicas e imunoensaio - todos detalhados a seguir), e a segunda etapa foi realizada na UFJF (análises histopatológicas, histomorfométricas, ensaios de imunoistoquímica e análises estatísticas).

Animais de experimentação

Camundongos BALB/c isogênicos, fêmeas, com idade variando de 6 a 8 semanas, pesando 20-25g, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP – MG - Brasil.

Condições de criação e manejo dos animais

Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, com camas de maravalha não esterilizada, no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto, a uma temperatura controlada ($21-22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar entre 50-55% (Termo-Higrômetro Digital $-50^{\circ} + 70^{\circ}\text{C}$ 910.15chp Allabrazil). Foi mantido um ciclo de iluminação (12h claro e 12h escuro, com início do ciclo de luz fluorescente a partir

das 7h). O ambiente foi exaurido a cada 15 minutos, mediante sistema automático controlado por *timer*. Os animais foram alimentados com ração paletizada e água em mamadeira *ad libitum*.

Durante a fase de exposição ao O₂ (descrita a seguir), mamadeiras de 60ml e ração triturada em cochos foram posicionadas internamente à câmara de inalação.

Grupos experimentais

Ao todo foram utilizados 30 camundongos (N=30) da linhagem BALB/c, dos quais n=06 foram utilizados como controle e não receberam quaisquer tipos de intervenção. Estes animais foram eutanasiados e serviram de padrão para análises que foram realizadas nos demais grupos experimentais n=06, conforme descritos na Figura 7.

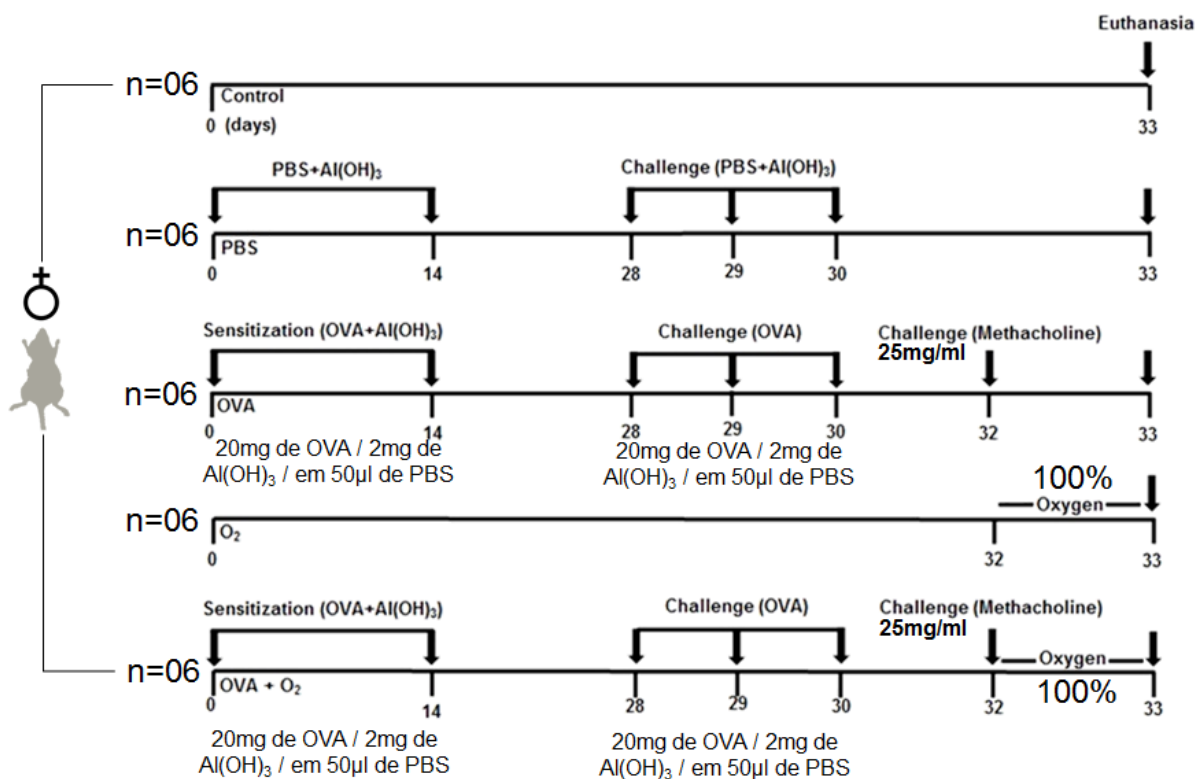


Figura 7 – Linha do tempo experimental da inflamação aguda das vias aéreas induzida por ovalbumina e hiperóxia em modelo de camundongos BALB/c de 06 a 08 semanas. Grupo Control (air room) (n=6) – Grupo controle de 06 animais que ficou ao ar ambiente e não sofreu qualquer intervenção. Grupo PBS + Al(OH)₃ (n=6) – Grupo de 06 animais que ficou ao ar ambiente, e no primeiro e no décimo quarto dia do experimento recebeu injeção intraperitoneal com tampão fosfato (PBS+Al(OH)₃), e no vigésimo oitavo, nono e trigésimo dia de experimento recebeu PBS+Al(OH)₃

intranasal. Grupo OVA (n=6) – Grupo que ficou ao ar ambiente, e no primeiro e no décimo quarto dia do experimento recebeu injeção intraperitoneal com ovalbumina (sensibilização), no vigésimo oitavo, nono e trigésimo dia de experimento foi atacado com ovalbumina intranasal (PBS diluído em $\text{Al}(\text{OH})_3$), e no trigésimo segundo dia foi submetido à metacolina nebulizada. Grupo O_2 (n=6) – Grupo que ficou ao ar ambiente, no trigésimo segundo dia foi exposto ao O_2 por 24 horas. Grupo OVA+ O_2 (n=6) – Grupo que ficou ao ar ambiente, e no primeiro e no décimo quarto dia do experimento recebeu injeção intraperitoneal com ovalbumina (sensibilização), no vigésimo oitavo, nono e trigésimo dia de experimento foi atacado com ovalbumina intranasal (PBS diluído em $\text{Al}(\text{OH})_3$), conforme procedimento descrito a seguir), e no trigésimo segundo dia foi submetido à metacolina nebulizada seguido de exposição imediata ao O_2 por 24 horas. A eutanásia de todos os grupos experimentais ocorreu no 33º dia. (Nagato, Bezerra *et al.*, 2012)

Modelo de inflamação aguda das vias aéreas (modelo de asma experimental)

através da sensibilização por ovalbumina⁴ (OVA) em camundongos fêmeas

BALB/c

Sensibilização com OVA intraperitoneal (IP) e/ou injeção de PBS diluído em

$\text{Al}(\text{OH})_3$

No primeiro dia experimental foi injetado, intraperitonealmente, um volume final de 50µL de solução de PBS em 2mg de hidróxido de alumínio em cada animal do Grupo PBS. Nos Grupos OVA e OVA+ O_2 , foi injetado em cada animal, intraperitonealmente, um volume final de 50µL de solução de 20mg de OVA em 2mg de hidróxido de alumínio. No 14º dia experimental este procedimento foi repetido.

Instilação intranasal com OVA ou PBS

Nos 28º, 29º e 30º dias experimentais os animais dos grupos OVA e OVA+ O_2 receberam um volume final de 50µL de solução de 20mg de OVA em 2mg de hidróxido de alumínio (adaptado de Kumar, 2008).

⁴ A ovalbumina utilizada (com sequência de aminoácido H-Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg-OH) foi adquirida em pó liofilizado, estocada a -20º.C (**Sigma-Aldrich**)

Nebulização com metacolina ou PBS

No 32º dia experimental os animais dos grupos OVA e OVA+ O₂ foram submetidos à nebulização (durante 40 min.) com concentração de 25mg/ml metacolina (adaptado de Kumar, Herbert et al. 2008).

Modelo de exposição ao O₂

O grupos experimentais que receberam O₂ foram expostos a condições de hiperóxia em uma câmara de inalação (comprimento=30cm, largura=20cm e altura=15cm) como descrito previamente pelo nosso grupo (Valenca Sdos, Kloss *et al.*, 2007); Nagato *et al.* 2009; Nagato *et al.* 2012). O O₂ medicinal foi adquirido da *White Martins*® (White Martins Praxair Inc. São Paulo, Brazil). Os dos grupos experimentais O₂ (n=06) e OVA+O₂ (n=06) receberam o O₂ com fluxo contínuo de 10L/min, por 24h, após o ataque com metacolina.

Dois cilindros contendo O₂ medicinal (8.000 L de O₂/cilindro) foram acoplados a uma válvula reguladora de pressão e um fluxômetro (com amplitude de mensuração de 0-15L/min.). Um conduto de silicone conectou o fluxômetro a uma câmara de inalação. Os animais do Grupo O₂ e Grupo OVA +O₂, foram colocados na câmara no 32º.dia experimental e ao término de 24 horas do início da exposição ao O₂ foi realizada eutanásia dos animais.

Análise de células do lavado broncoalveolar (BAL) e eutanásia

Após a sedação com Ketamina (100 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg), a traqueia foi exposta através de secção cirúrgica na linha média e os pulmões e as vias aéreas dos animais foram lavados três vezes com 500µL (volume final igual 1,2-1,5 ml). Em seguida, 500µL foi utilizado imediatamente, para contagem total de células

mononucleares e polimorfonucleares através da Zi Coulter counter (Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA) e o volume restante foi estocado à -86°C para análises bioquímicas. Logo em seguida a eutanásia foi realizada mediante deslocamento cervical.

Remoção dos pulmões

Cada animal foi posicionado em decúbito dorsal, e os membros foram fixados em abdução, e hiperextensão de cabeça para facilitar visualização do pescoço (para dissecação anatômica da traqueia – ver adiante) e do tórax, e para assepsia (álcool à 70%). Uma incisão cirúrgica na linha média foi realizada desde o processo xifóideo até a região submadibular. A pele foi rebatida, e em seguida foram desinseridos os músculos peitorais, maior e menor, para melhor visualização dos espaços intercostais. Uma incisão cirúrgica sobre a pele da linha média do tórax foi realizada a partir do processo xifóideo até cerca de 2 cm inferiormente, para que fosse rebatido o epitélio abdominal lateralmente, e a região subdiafragmática fosse exposta. Após rebater o fígado inferiormente, e desinsere o músculo diafragma, foi realizada toracotomia esquerda e direita, e as costelas foram rebatidas superiormente para exposição anatômica dos pulmões e coração. Os pulmões foram coletados após desinserção das estruturas anatômicas adjacentes, através do pinçamento do mediastino, de tal forma que os pulmões não fossem manipulados diretamente. O pulmão direito de cada animal foi coletado para análises histopatológicas e de imunoistoquímicas, e o pulmão esquerdo foi homogeneizado, centrifugado 7500rpm por 10 minutos, e o sobrenadante colhido e armazenado à -80°C.

Homogeneizado pulmonar

O pulmão direito foi adicionado ao tubo de hemólise contendo 1ml de tampão fosfato, e foi homogeneizado utilizando um homogeneizador de tecidos. Em seguida as amostras homogeneizadas serão centrifugadas à 7500rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi colhido e armazenado à -80°C para realização de imunoensaio (ELISA) e análises bioquímicas (dosagem de nitrito, descrito a seguir), e o pellet foi descartado.

Análises de estresse e dano oxidativo

Todos os reagentes para as análises bioquímicas foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co., (St. Louis, MO, USA). Todas as análises bioquímicas foram realizadas a partir do homogeneizado pulmonar (Beckman model DU 640; Fullerton, CA, USA). A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada a partir da taxa de redução de peróxido de hidrogênio, que foi medida por espectrofotometria à 240 nm (Aebi, 1984). O nível de malondialdeído (MDA) foi mensurado durante a reação ácido-aquecida com o ácido tiobarbitúrico, e foi determinada a 532 nm (Draper e Hadley, 1990). O total do conteúdo de proteínas no BAL e homogeneizado pulmonar foi mensurado de acordo com o método de Bradford's (Bradford, 1976).

Mensuração das quimiocinas TNF α , CCL2 e CCL5 por ELISA

O conteúdo de TNF α , CCL2 e CCL5 foram analisados a partir do sobrenadante do homogeneizado pulmonar. O sobrenadante foi combinado com o fluido inflamatório e mensurado por ELISA (R&D systems). Resumidamente, a microplaca de 96 poços foi revestida com 100 μ L/poço com de anticorpos monoclonais apropriados durante 18h a 48C, e em seguida foi lavada com tampão

de lavagem (1_PBS, 0,05% de Tween-20). Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com 200 µL/poço de tampão de bloqueio (BSA a 1% em PBS). As placas foram lavadas com tampão de lavagem e adicionaram-se adequadamente amostras diluídas (100µL/cavidade), seguido de incubação durante 18 h a 48C. As placas foram então lavadas, e 100 mL/poço do kit de detecção com anticorpos biotinilados diluídos em tampão de bloqueio, contendo 0,05% de Tween-20 foram adicionados durante 1h a temperatura ambiente. As placas foram então lavadas, estreptavidina e peroxidase foram adicionadas (100 µl/poço), e as placas foram incubadas durante 30 min à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas, e foi adicionado 100 µl/poço de substrato de OPD - cromogênio (O-fenilenodiamina, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) em tampão de citrato 30 mM (pH 5,0) contendo 0,02% v/v H₂O₂, e as placas foram incubadas no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. A reação foi terminada com 50 µL/poço de H₂SO₄ 1M. As placas foram lidas a 492 nm num espectrofotômetro (Emax-Molecular Devices). Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. O limiar de sensibilidade para cada quimiocina foi de 15,625 pg/µL

Preparação dos pulmões para histopatologia

Os pulmões foram mantidos por 48 horas imersos em formalina 4%, tamponada, na proporção de 20 vezes o volume de formalina para o volume de amostra. Após a fixação, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 hora cada, sendo feitos 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em 3 banhos em xilol de 1 hora cada, e finalmente feita à impregnação em parafina em estufa a 60°C e a inclusão na parafina a temperatura ambiente. Os blocos foram então cortados em

micrótono modelo “820” Spencer com espessura de 5µm para serem coradas em hematoxilina–eosina (HE) e em 4µm para os ensaios de imuno-histoquímicas.

Para a coloração em HE, os tecidos foram desparafinados em três trocas de xilol (dois minutos cada) e hidratados em soluções de etanol com concentrações decrescentes com duas trocas a 100%, uma a 90% e uma a 70% (dois minutos em cada troca) e lavados em água destilada. A coloração HE foi realizada, tanto para tecidos normais quanto para tecidos patológicos, visando identificar os núcleos corados em azul escuro (basofílicos) e o citoplasma em róseo (eosinofílicos). Após a hidratação, os tecidos foram corados durante 15 minutos pela Hematoxilina de Harris: 5g de hematoxilina dissolvidos em 50 mL de álcool absoluto e 100 g de alúmen de amônio ou potássio em 1000 mL de água destilada aquecida. As duas soluções foram misturadas e fervidas. Em seguida foi adicionado 2,5g de óxido de mercúrio, reaquecido até tornar-se púrpuro escuro; foi retirada do aquecimento e esfriada rapidamente. Foram adicionados 2 a 4 mL de ácido acético glacial por 100 mL de solução, filtrado antes do uso e o material foi lavado e azulados em água corrente por 5 minutos e água amoniacal (200mL de água destilada com 3 gotas de hidróxido de amônio), corados pela solução de eosina aquosa 1% durante 2 minutos e diferenciados em etanol a 70%.

Análise histopatológica, histomorfométricas e estereológica das vias aéreas

Os cortes de traqueia e pulmões corados em hematoxilina e eosina foram analisados por microscopia de luz (Zeiss - Hallbergmoos, Alemanha) em magnitude de 400X e 1000X. Foram realizadas fotomicrografias de dez campos/secção pulmonar e posteriormente realizada morfometria digital (Axion Vision - Zeiss, Berlim, Alemanha). A mensuração da densidade de volume de parênquima

pulmonar (A_{par}) de cada amostra foi realizada subtraindo a área total ocupada por espaço aéreo (A_{air}), da área total da fotomicrografia (A_{imagem}) – então: ($A_{par} = A_{imagem} - A_{air}$). Em seguida, os valores foram agrupados de acordo com os grupos experimentais, realizadas médias aritméticas, e em seguida os resultados foram estimados em milímetros quadrados.

Análise histopatológica

Os cortes corados em hematoxilina e eosina foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 200X e 400X em toda sua extensão. Quando necessário foi identificada a estrutura no aumento de 1000X. A análise foi realizada por três diferentes observadores com formação em patologia e morfologia. A partir desta avaliação, foram selecionadas, em aumento de 400x, cinco áreas em cada amostra para captura digital por sistema computadorizado Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), através de câmera digital acoplada a microscópio óptico.

Análise histomorfométrica e histoestereológica

A análise morfométrica foi realizada sobre secções pulmonares coradas com hematoxilina e eosina. Foi medida a densidade de número de mononucleares e polimorfonucleares nas regiões peribronquiolares e na luz alveolar. Foi analisado um total de 10 campos não coincidentes por lâmina histológica ($5,9 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$), sob o aumento de 400x, (lente objetiva de 40x Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para ambas as análises foram utilizadas um vídeo-microscópio Zeiss-Axioplan, e uma câmara de vídeo (Trinitron; Sony, San Diego, CA, EUA) ligada a um monitor colorido (Trinitron; Sony). Dois investigadores contaram as lâminas sem identificação prévia.

Imuno-histoquímica

O método do complexo avidina-biotina peroxidase foi utilizado para verificar a expressão de iNOS, Nrf2, Tbet, e IL17 no tecido peribronquiolar e parênquima pulmonar dos animais. O tecido foi inicialmente aquecido em estufa (60°): 20'-30', desparafinado em xilol (três banhos de 5' cada), hidratado em álcool 100%; 95%, 70% (3' cada), e lavado em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com H₂O₂ 30% em metanol- 60'. Foi realizada recuperação antigênica em Banho Maria (95°) com PBS: 40'. O tecido foi resfriado por 20' (temperatura ambiente). O *Background sniper* foi adicionado (4 gotas) e incubado durante 15' (temperatura ambiente). As amostras foram incubadas em uma solução de anticorpo primário (1:20), durante 1h em câmara úmida. Em seguida o *Link Universal Teckie* foi adicionado (4 gotas) e incubado por 20'. Seguido de adição de *Trek Avidin -HRP label* - streptavidina 10' (temperatura ambiente- câmara úmida). Foram adicionadas às amostras *Betazoid DAB Chromogen* (1 gota - DAB) e após contracoloração com Hematoxilina o tecido foi desidratado em álcool : 3x - álcool 100%, diafanizado em xilol e as lâminas foram montadas em Entelan. Em cada secção pulmonar, a densidade de imunocoloração positiva (por iNOS, Nrf2, Tbet, e IL17) foi medida pela tonalidade de tons de marrom através da densidade de reação cromogênico-histoquímica (mm²). A densidade de imunocoloração foi corrigida pela densidade de parênquima pulmonar.

Análise estatística

Os dados foram expressos em média aritmética e erro padrão da média (SEM). Para os dados contínuos, foi utilizado um one-way ANOVA seguida por Student-Newman-Keuls post hoc teste (para o CAT, MDA, proteína, BAL, e resultados morfométricos). Para dados não-contínuos, foi utilizado o Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn (resultados estereológicos). Em todos os casos, o nível de significância foi fixado em 5% ($P < 0,05$). As análises foram realizadas de GraphPad Prism Versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo científico em anexo.

7 CONCLUSÕES

Na análise histopatológica houve uma intensa infiltração celular para o interstício, especialmente para as regiões peribronquiolares, corroborando com achados da literatura. Houve também áreas evidentes de alargamento do tecido peribronquiolar ligada à inflamação aguda das vias aéreas induzidas por ovalbumina seguida de hiperóxia. Entretanto, quando a inflamação induzida por ovalbumina foi sobreposta pela hiperóxia, foi observada uma redução do número total de células inflamatórias no lavado broncoalveolar. Uma possível hipótese é que após a migração destas células para as vias aéreas ocorre a morte induzida por dano oxidativo causada pela hiperóxia, enquanto células do interstício pulmonar são preservadas. Juntos, nossos dados sugerem que a hiperóxia promove polarização de células Th1 e Th17 na resposta imune do tecido danificado (localmente), com estresse oxidativo e migração de células inflamatórias, particularmente neutrófilos para os tecidos e vias aéreas. Nossas perspectivas sugerem que os estudos que buscarem esclarecer os diferentes padrões de resposta imune na asma, sobretudo a respeito do paradigma Th1/Th2/Th17, possam contribuir importantemente para a compreensão do processo fisiopatológico da asma aguda, e resultar possivelmente em melhores abordagens terapêuticas.

8 REFERÊNCIAS

1. Abraham, S. N. and A. L. St John (2010). "Mast cell-orchestrated immunity to pathogens." Nat Rev Immunol **10**(6): 440-52.
2. Aebi H. In: Catalase in Vitro. Methods in Enzymology. Colowick SP, Kaplan NO, editors. Vol. 105. Florida: Acad. Press; 1984. pp. 114–121.
2. AMORIM, Antonio J.; DANELUZZI, Júlio C. Prevalência de asma em escolares. J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre , v. 77, n. 3, p. 197-202, June 2001 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572001000300010&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572001000300010>.
3. Anderson, H. R., B. K. Butland, et al. (2012). "Satellite-based estimates of ambient air pollution and global variations in childhood asthma prevalence." Environ Health Perspect **120**(9): 1333-9.
4. Barnes, P. J. (2008). "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Nat Rev Immunol **8**(3): 183-92.
5. Barnes, P. J. (1996). "Pathophysiology of asthma." Br J Clin Pharmacol **42**(1): 3-10.
6. Becker, A., C. Lemiere, et al. (2006). "2003 canadian asthma consensus guidelines executive summary." Allergy Asthma Clin Immunol **2**(1): 24-38.
7. Bhandari, V. and J. A. Elias (2006). "Cytokines in tolerance to hyperoxia-induced injury in the developing and adult lung." Free Radic Biol Med **41**(1): 4-18.
8. Boe, J., J. H. Dennis, et al. European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers. Eur Respir J, v.18, n.1, Jul, p.228-42. 2001.

9. Boulet, L. P., A. Becker, et al. (1999). "Canadian Asthma Consensus Report, 1999. Canadian Asthma Consensus Group." CMAJ **161**(11 Suppl): S1-61.
10. Bowler, R. P. e J. D. Crapo. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? Am J Respir Crit Care Med, v.166, n.12 Pt 2, Dec 15, p.S38-43. 2002.
11. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
12. Brueckl, C., S. Kaestle, et al. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. Am J Respir Cell Mol Biol, v.34, n.4, Apr, p.453-63. 2006.
13. Busse, W. W. and R. F. Lemanske, Jr. (2001). "Asthma." N Engl J Med **344**(5): 350-62.
14. Carvalho, R. M., F. R. Rodrigues Da Silva, et al. Exhaled nitric oxide and quality of life in asthmatic teenagers. World Allergy Organization Journal, v.8, n.1, p.1-1. 2015.
15. CASAGRANDE, Rejane R D et al . Prevalência de asma e fatores de risco em escolares da cidade de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo , v. 42, n. 3, p. 517-523, June 2008. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102008000300018&lng=en&nrm=iso. access on 25 Mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102008000300018>.
16. CHATKIN, Moema N.; MENEZES, Ana Maria B.. Prevalência e fatores de risco para asma em escolares de uma coorte no Sul do Brasil. J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre, v. 81, n. 5, Oct. 2005 . Available from

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572005000600013&lng=en&nrm=iso>. access on 09 May 2012.

<http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1393>

17. Chien, J. W., R. Ciuffo, et al. (2000). "Uncontrolled oxygen administration and respiratory failure in acute asthma." Chest **117**(3): 728-33.
18. Cho, H. Y., A. E. Jedlicka, et al. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. Am J Respir Cell Mol Biol, v.26, n.2, Feb, p.175-82. 2002.
19. Comhair, S. A., M. J. Thomassen, et al. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O₂ or cigarette smoke. Am J Respir Cell Mol Biol, v.23, n.3, Sep, p.350-4. 2000.
20. Comhair, S. A. e S. C. Erzurum. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.283, n.2, Aug, p.L246-55. 2002.
21. Cooper, P. J., L. C. Rodrigues, et al. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. Allergy, v.64, n.1, Jan, p.5-17. 2009.
22. Demchenko, I. T., D. N. Atochin, et al. Contributions of nitric oxide synthase isoforms to pulmonary oxygen toxicity, local vs. mediated effects. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.294, n.5, May, p.L984-90. 2008.
23. Desai, L. P., S. E. Sinclair, et al. High tidal volume mechanical ventilation with hyperoxia alters alveolar type II cell adhesion. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.293, n.3, Sep, p.L769-78. 2007.
24. Draper, H. H. and M. Hadley (1990). "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation." Methods Enzymol **186**: 421-31. D'Autreaux B, Toledano MB. Ros as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ros homeostasis. *Nature reviews* 2007;8:813-824.

25. D'autreaux, B. e M. B. Toledano. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.10, Oct, p.813-24. 2007.
26. Edwards, M. R., N. W. Bartlett, *et al.* The microbiology of asthma. Nat Rev Microbiol, v.10, n.7, Jul, p.459-71. 2012.
27. Fattman, C. L., L. M. Schaefer, *et al.* Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radic Biol Med, v.35, n.3, Aug 1, p.236-56. 2003.
28. Fiori, N. S., H. Goncalves, *et al.* Ten-year trends in prevalence of asthma in adults in southern Brazil: comparison of two population-based studies. Cad Saude Publica, v.28, n.1, Jan, p.135-44. 2012.
29. Freeman, B. A. e J. D. Crapo. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. J Biol Chem, v.256, n.21, Nov 10, p.10986-92. 1981.
30. Galli, S. J., M. Tsai, *et al.* The development of allergic inflammation. Nature, v.454, n.7203, Jul 24, p.445-54. 2008.
31. Giorgio, M., M. Trinei, *et al.* Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? Nat Rev Mol Cell Biol, v.8, n.9, Sep, p.722-8. 2007.
32. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Updated 2015. http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015.pdf. 20th May 2015.
33. Bousquet, J. e W. W. Busse. Section 1. EPR-3 versus GINA 2008 Guidelines - Asthma Control and Step 3 Care: Highlights of the Asthma Summit 2009: Beyond the Guidelines. World Allergy Organ J, v.3, n.2, p.16-22. 2010.

34. Gualdi L.P., Pereira A.C., et al. Murine models for asthma research: an updated critical analysis. *Sci Med (Porto Alegre)* 20:236–242. 2010.
35. Gueders, M. M., G. Paulissen, *et al.* Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*, v.58, n.12, Dec, p.845-54. 2009.
36. Holt, P. G., D. H. Strickland, *et al.* Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*, v.8, n.2, Feb, p.142-52. 2008.
37. Hussain, S. P., L. J. Hofseth, *et al.* Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*, v.3, n.4, Apr, p.276-85. 2003.
38. Inwald, D., M. Roland, *et al.* Oxygen treatment for acute severe asthma. *BMJ*, v.323, n.7304, Jul 14, p.98-100. 2001.
39. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J. bras. pneumol.*, São Paulo, v. 32, supl. 7, p. S447-S474, Nov. 2006. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132006001100002&lng=en&nrm=iso>. access on 24 Mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006001100002>.
40. Jackson, R. M. Pulmonary oxygen toxicity. *Chest*, v.88, n.6, Dec, p.900-5. 1985.
41. Jungsuwadee, P., M. R. Weaver, *et al.* The metalloporphyrin antioxidant, MnTE-2-PyP, inhibits Th2 cell immune responses in an asthma model. *Int J Mol Sci*, v.13, n.8, p.9785-97. 2012.
42. Kaplan, A. P. A new mechanism for immunologic initiation of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.102, n.5, Feb 1, p.1267-8. 2005.
43. Saunders, K. (1993). Origin of the word “asthma.” *Thorax*, 48(6), 647.

44. Kohno, M., A. Ishizaka, *et al.* Hyperoxia-induced emphysematous changes in subacute phase of endotoxin-induced lung injury in rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.287, n.1, Jul, p.L184-90. 2004.
45. Korn, T., E. Bettelli, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.485-517. 2009.
46. Kumar, R. K., C. Herbert, *et al.* (2008). "The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice." Curr Drug Targets **9**(6): 485-94.
47. Lafond, C., F. Series, *et al.* Impact of CPAP on asthmatic patients with obstructive sleep apnoea. Eur Respir J, v.29, n.2, Feb, p.307-11. 2007.
48. Laloi, C., K. Apel, *et al.* Reactive oxygen signalling: the latest news. Curr Opin Plant Biol, v.7, n.3, Jun, p.323-8. 2004.
49. Lemiere, C., T. Bai, *et al.* Adult Asthma Consensus Guidelines update 2003. Can Respir J, v.11 Suppl A, May-Jun, p.9A-18A. 2004.
50. Li, Z., R. Choo-Wing, *et al.* A potential role of the JNK pathway in hyperoxia-induced cell death, myofibroblast transdifferentiation and TGF-beta1-mediated injury in the developing murine lung. BMC Cell Biol, v.12, p.54. 2011.
51. Luna Mde, F., P. C. Almeida, *et al.* [Asthma and rhinitis prevalence and co-morbidity in 13-14-year-old schoolchildren in the city of Fortaleza, Ceara State, Brazil]. Cad Saude Publica, v.27, n.1, Jan, p.103-12. 2011.
52. Macedo, S. E., A. M. Menezes, *et al.* [Risk factors for asthma in adults in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil]. Cad Saude Publica, v.23, n.4, Apr, p.863-74. 2007.
53. Macpherson, J. C., S. A. Comhair, *et al.* Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available

to eosinophils for generating reactive nitrogen species. J Immunol, v.166, n.9, May 1, p.5763-72. 2001.

54. Mccord, J. M. e I. Fridovich. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. J Biol Chem, v.244, n.22, Nov 25, p.6056-63. 1969.

55. Morse, D., L. E. Otterbein, *et al.* Deficiency in the c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathway confers susceptibility to hyperoxic lung injury in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.285, n.1, Jul, p.L250-7. 2003.

56. Mosmann, T. R. e R. L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, v.7, p.145-73. 1989.

57. Nagato, A., F. L. Silva, *et al.* Hyperoxia-induced lung injury is dose dependent in Wistar rats. Exp Lung Res, v.35, n.8, Oct, p.713-28. 2009.

58. Nagato, A. C., F. S. Bezerra, *et al.* Time course of inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by hyperoxia in mouse lungs. Int J Exp Pathol, v.93, n.4, Aug, p.269-78. 2012.

59. Narasaraju, T. A., N. Jin, *et al.* Protein nitration in rat lungs during hyperoxia exposure: a possible role of myeloperoxidase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.285, n.5, Nov, p.L1037-45. 2003.

60. National Asthma, E. e P. Prevention. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. J Allergy Clin Immunol, v.120, n.5 Suppl, Nov, p.S94-138. 2007.

61. O'driscoll, B. R., L. S. Howard, *et al.* British Thoracic Society emergency oxygen audits. Thorax, v.66, n.8, Aug, p.734-5. 2011.

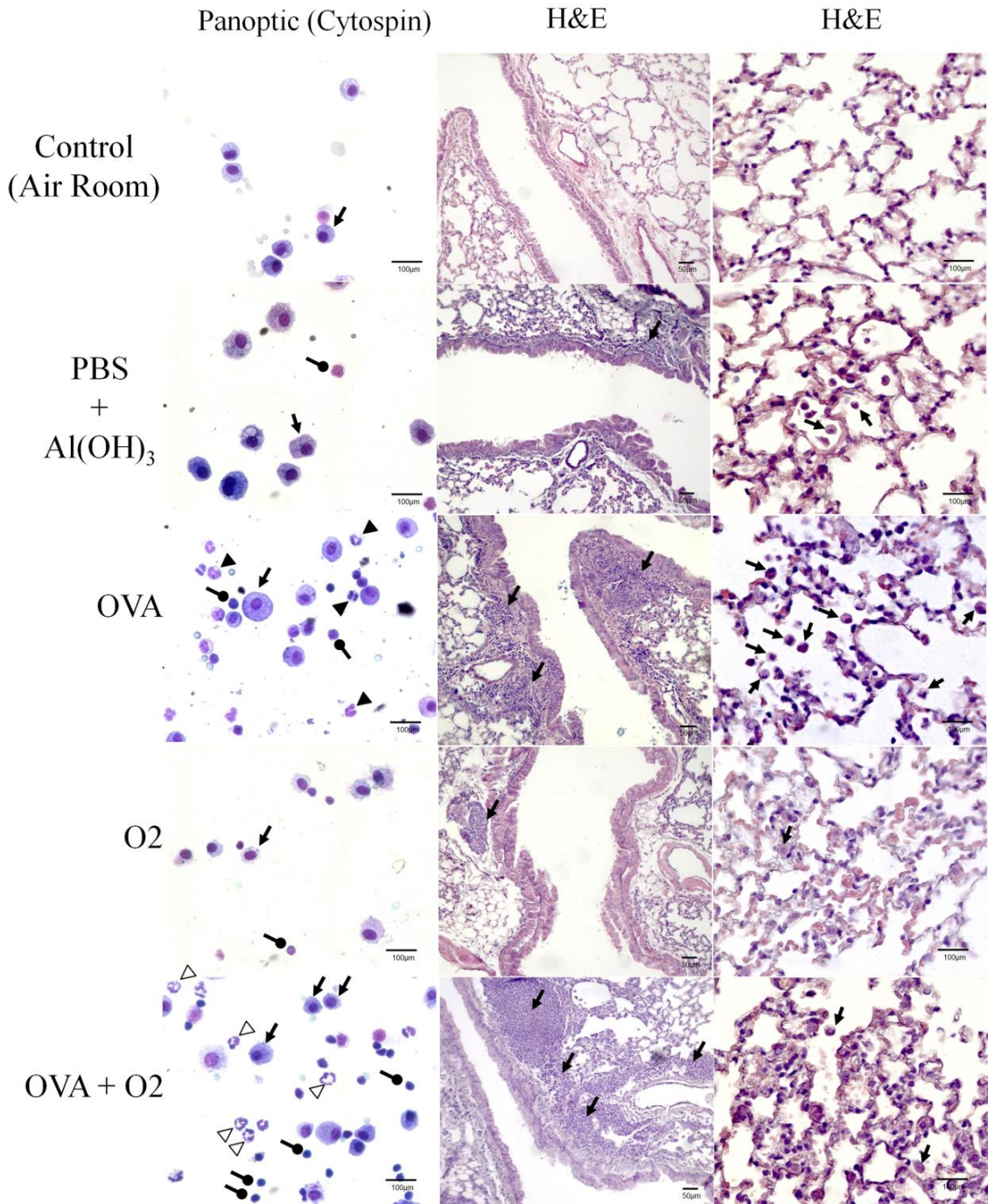
62. Parinandi, N. L., M. A. Kleinberg, *et al.* Hyperoxia-induced NAD(P)H oxidase activation and regulation by MAP kinases in human lung endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.284, n.1, Jan, p.L26-38. 2003.
63. Pearce, N. e J. Douwes. The Latin American exception: why is childhood asthma so prevalent in Brazil? J Pediatr (Rio J), v.82, n.5, Sep-Oct, p.319-21. 2006.
64. Pepperl, S., M. Dorger, *et al.* Hyperoxia upregulates the NO pathway in alveolar macrophages in vitro: role of AP-1 and NF-kappaB. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.280, n.5, May, p.L905-13. 2001.
65. Perkowski, S., A. Scherpereel, *et al.* Dissociation between alveolar transmigration of neutrophils and lung injury in hyperoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.291, n.5, Nov, p.L1050-8. 2006.
66. Petrache, I., M. E. Choi, *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway mediates hyperoxia-induced apoptosis in cultured macrophage cells. Am J Physiol, v.277, n.3 Pt 1, Sep, p.L589-95. 1999.
67. Popovic, V., R. Gerschman, *et al.* Effect of High Oxygen Pressure on Ground Squirrels in Hypothermia and Hibernation. Am J Physiol, v.206, Jan, p.49-50. 1964.
68. Quan, Y. F., M. C. Zheng, *et al.* [Expression of heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in the lungs of hyperoxia-exposed preterm rats]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, v.13, n.7, Jul, p.577-80. 2011.
69. Rancourt, R. C., P. C. Keng, *et al.* The role of p21(CIP1/WAF1) in growth of epithelial cells exposed to hyperoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.280, n.4, Apr, p.L617-26. 2001.
70. Rodrigo, G. J., C. Rodrigo, *et al.* Acute asthma in adults: a review. Chest, v.125, n.3, Mar, p.1081-102. 2004.

71. Rodrigo, G. J., M. Rodriguez Verde, *et al.* Effects of short-term 28% and 100% oxygen on PaCO₂ and peak expiratory flow rate in acute asthma: a randomized trial. Chest, v.124, n.4, Oct, p.1312-7. 2003.
72. Sole, D., I. C. Camelo-Nunes, *et al.* Asthma in children and adolescents in Brazil: contribution of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Rev Paul Pediatr, v.32, n.1, Mar, p.114-25. 2014.
73. Shi, Y., Y. Jin, *et al.* Blockage of nerve growth factor modulates T cell responses and inhibits allergic inflammation in a mouse model of asthma. Inflamm Res, v.61, n.12, Dec, p.1369-78. 2012.
74. Shin, Y. S., K. Takeda, *et al.* Understanding asthma using animal models. Allergy Asthma Immunol Res, v.1, n.1, Oct, p.10-8. 2009.
75. Tokuda, Y. e S. Miyagi. Oxygen treatment for acute severe asthma. Home oxygenation would be more effective. BMJ, v.323, n.7320, Nov 3, p.1069. 2001.
76. Tsan, M. F., N. J. Tacy, *et al.* Protection of rats against oxygen toxicity by tracheal administration of plasmid DNA: role of endogenous tumor necrosis factor. Proc Assoc Am Physicians, v.109, n.4, Jul, p.409-19. 1997.
77. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, v.552, n.Pt 2, Oct 15, p.335-44. 2003.
78. Valenca Sdos, S., M. L. Kloss, *et al.* [Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs]. J Bras Pneumol, v.33, n.6, Nov-Dec, p.655-62. 2007.
79. Van Den Berghe, G. How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? J Clin Invest, v.114, n.9, Nov, p.1187-95. 2004.
80. Vock C, Hauber HP, Wegmann M. The other T helper cells in asthma pathogenesis. Journal of allergy.2010:519298.

81. Wang, Y., S. I. Feinstein, et al. (2004). "Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice." Free Radic Biol Med **37**(11): 1736-43.
82. Ward, N. S., A. B. Waxman, et al. (2000). "Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(5): 535-42.
83. WEHRMEISTER, Fernando César et al . Tendência temporal de asma em crianças e adolescentes no Brasil no período de 1998 a 2008. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo , v. 46, n. 2, p. 242-250, Apr. 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102012000200006&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Mar. 2016. Epub Feb 03, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102012005000008>.
84. Wenzel, S. E. (2012). "Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches." Nat Med **18**(5): 716-25.
85. Whitehead, G. S., L. H. Burch, et al. (2006). "Genetic basis of murine responses to hyperoxia-induced lung injury." Immunogenetics **58**(10): 793-804.
86. Yao, Y., S. Lu, et al. (2012). "Low doses of exogenous interferon-gamma attenuated airway inflammation through enhancing Fas/FasL-induced CD4+ T cell apoptosis in a mouse asthma model." J Interferon Cytokine Res **32**(11): 534-41.
87. Zaher, T. E., E. J. Miller, et al. Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonary epithelial cells. Free Radic Biol Med, v.42, n.7, Apr 1, p.897-908. 2007.
88. Zhu, J., H. Yamane, et al. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol, v.28, p.445-89. 2010.

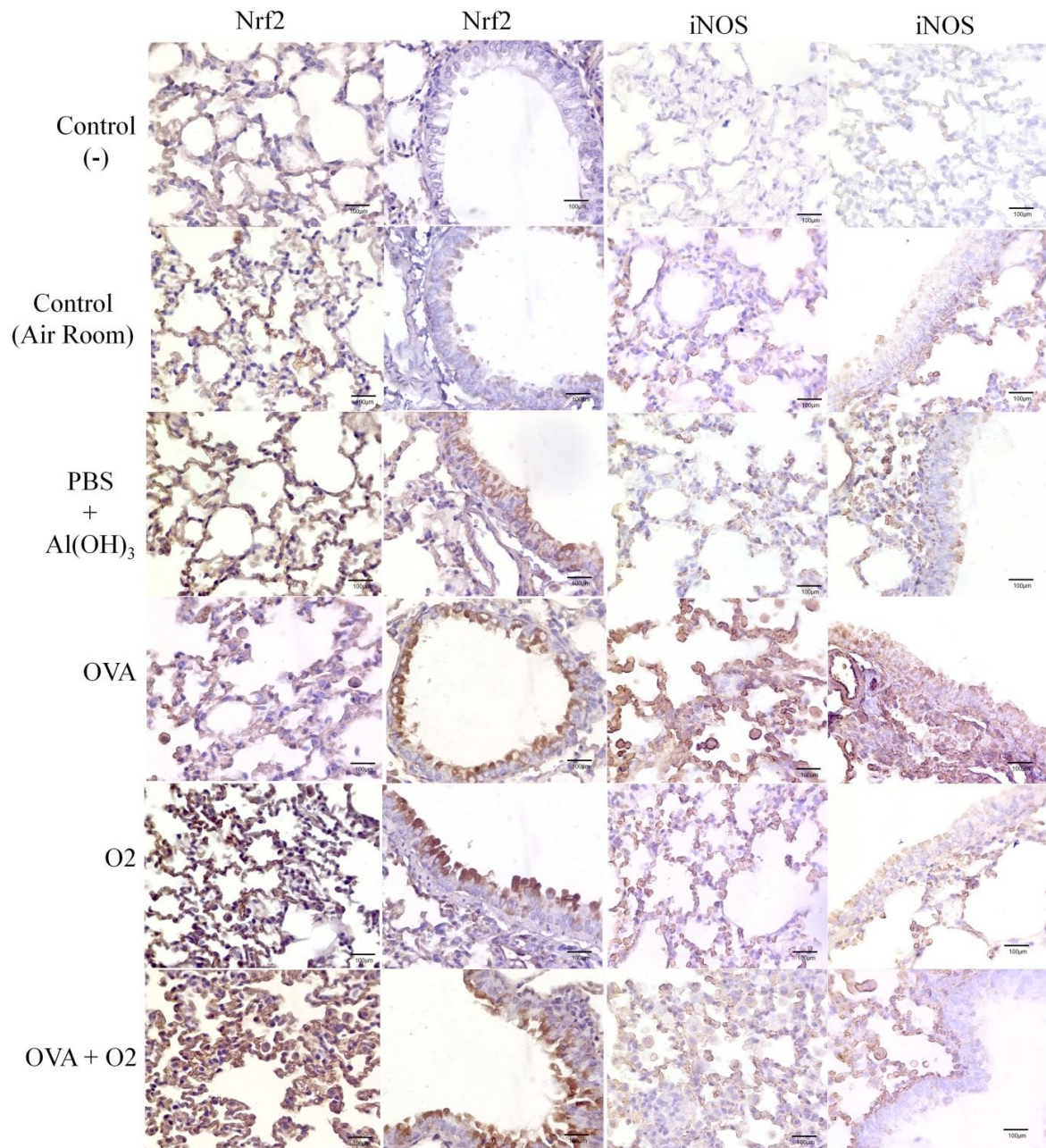
APENDICE A

Os direitos de publicação foram transferidos para Immunity, inflammation disease. Consultar referencia: Nagato, A. C., F. S. Bezerra, *et al.* Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH17 cell phenotype. *Immun Inflamm Dis*, v.3, n.3, Sep, p.321-37. 2015.



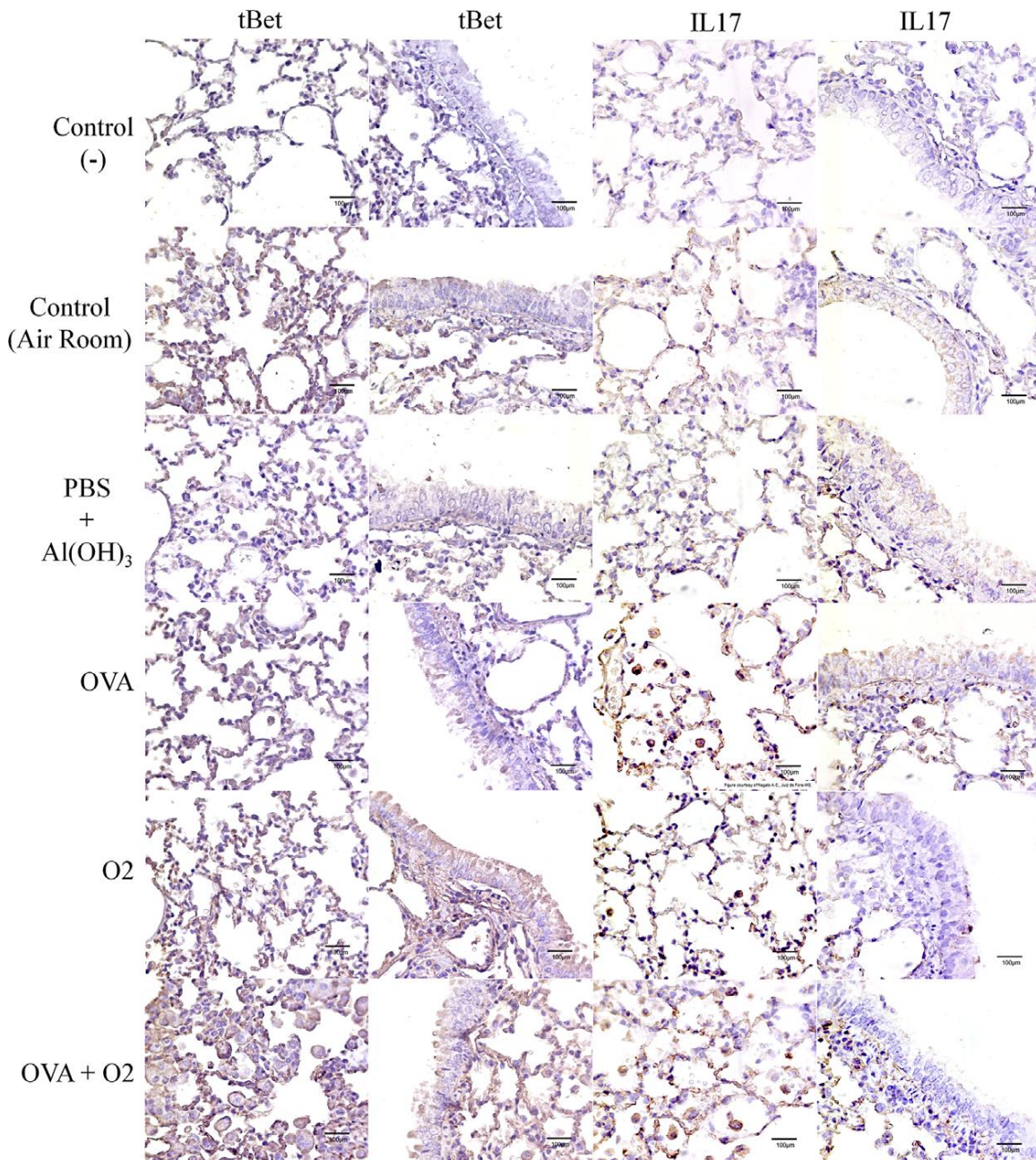
APENDICE B

Os direitos de publicação foram transferidos para Immunity, inflammation disease. Consultar referencia: Nagato, A. C., F. S. Bezerra, *et al.* Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH17 cell phenotype. *Immun Inflamm Dis*, v.3, n.3, Sep, p.321-37. 2015.



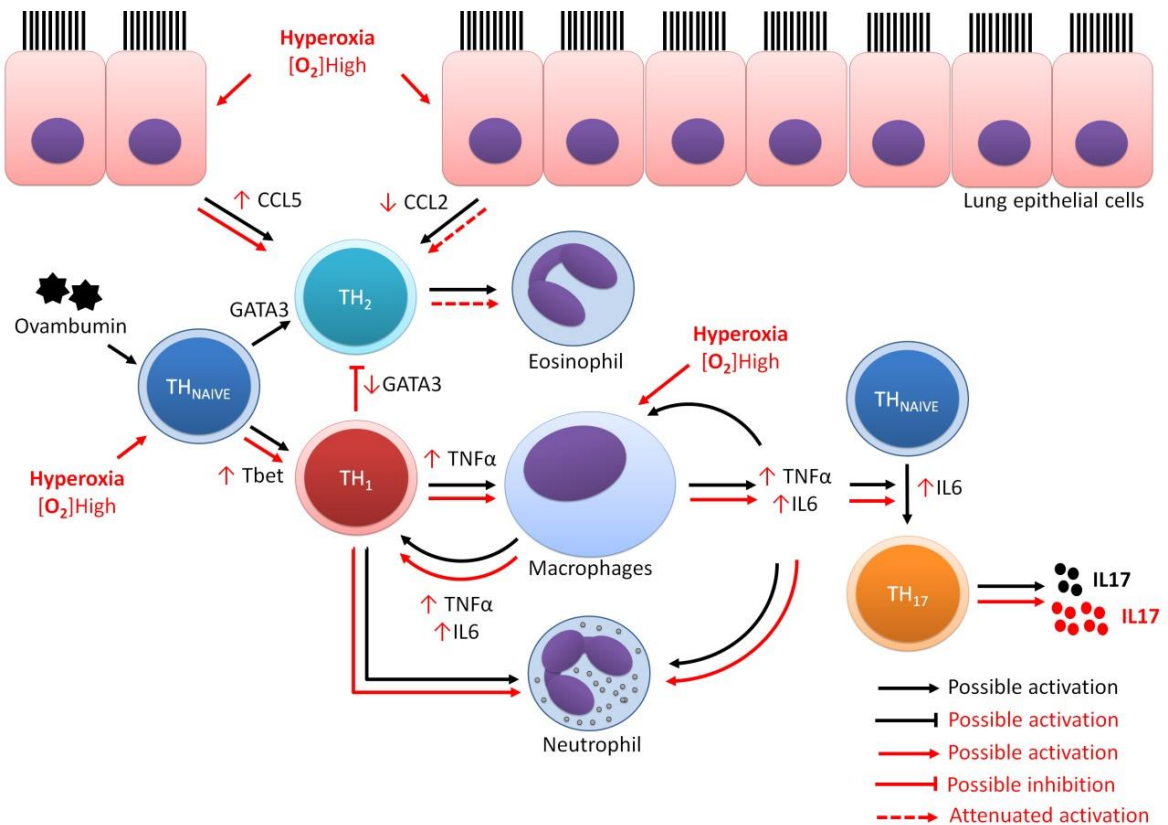
APENDICE C

Os direitos de publicação foram transferidos para Immunity, inflammation disease. Consultar referencia: Nagato, A. C., F. S. Bezerra, *et al.* Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH17 cell phenotype. Immun Inflamm Dis, v.3, n.3, Sep, p.321-37. 2015.



APENDICE C

Os direitos de publicação foram transferidos para Immunity, inflammation disease. Consultar referencia: Nagato, A. C., F. S. Bezerra, *et al.* Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH17 cell phenotype. *Immun Inflamm Dis*, v.3, n.3, Sep, p.321-37. 2015.



**ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOL DO COMITÊ DE
ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 107/2012, de 10 de outubro de 2012.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

DECBI/ICEB/UFOP

Senhor Pesquisador,

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

Atenciosamente,

Wanderson Geraldo de Lima
Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Coordenador da CEUA/UFOP.

ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA I



Certificamos que

o trabalho 08.006 - DOES HYPEROXIA REDUCES THE CHEMOATTRACTION OF MACROPHAGES IN OVALBUMIN-INDUCED LUNG INFLAMMATION BY INHIBITION OF CCL2? Nagato AC, Campos KKD, Martins TL, Talvani A, Aarestrup BJ, Aarestrup FM, Bezerra FS, - Center in Biology of Reproduction – UFJF, Department of Biological Sciences (DECBI) - UFOP, foi apresentado sob a forma de painel na

XXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada no Centro de Convenções do Hotel Gloria em Caxambu - MG, de 27 a 30 de agosto de 2014.

Comissão Organizadora



ANEXO C – PRODUÇÃO CIENTÍFICA II

Aarestrup et al. *World Allergy Organization Journal* 2015, **8**(Suppl 1):A50
<http://www.waojournal.org/content/8/S1/A50>

WAO journal
 WORLD ALLERGY ORGANIZATION

MEETING ABSTRACT

Open Access

Hyperoxia increases interleukin-17 in airway epithelial cells, alveolar type II cells and alveolar macrophages after ovalbumin-induced lung inflammation

Fernando Monteiro Aarestrup^{1*}, Akinori Nagato¹, Thais Martins², Keila Campos², Beatriz Aarestrup¹, Frank Bezerra²

From 3rd WAO International Scientific Conference (WISC) 2014
 Rio de Janeiro, Brazil. 6-9 December 2014

Background

There is no clear evidence on the pattern of inflammatory responses in exacerbation of neither asthma nor whether the hyperoxia is able to modify it. Because the hyperoxia induces reactive oxygen species and oxidative stress we believe this condition could interfere in the expression of interleukin-17 (IL17) in airway epithelial cells, alveolar type II cells and alveolar macrophages.

Methods

The experimental design was approved by the Ethics Committee of Federal University of Ouro Preto (UFOP)-No.092/2012. Groups of female BALB/c mice (8 weeks old; 24.53±0.31g) were divided randomly in to five experimental groups as follows: Control group (CG) remained to air room; PBS group received aluminum hydroxide in phosphate buffered saline (PBS); OVA group (OVA) received ovalbumin and aluminum hydroxide in PBS; O₂ group (O₂) was exposed to 100% oxygen in a chamber for 24h; OVA+O₂ group (OVA+O₂) was exposed to 100% oxygen for 24h, received ovalbumin and aluminum hydroxide in PBS. The data were presented as the mean ± standard error of the mean. For continuous data, we used a One-Way Anova followed by the Student–Newman–Keuls post hoc test. For non-continuous data, we used the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn's post hoc test. In all instances, the significance level was set at 5% (p<0.05).

Results

In bronchoalveolar lavage the hyperoxia decreases macrophage number in O₂ (2.82±0.20) and OVA+O₂ (1.72±0.15) and increases neutrophils number in O₂ (1.79±0.13) and OVA+O₂ (1.72±0.15), compared to CG (macrophage: 5.36±0.33) and (neutrophils: 0.02±0.00). The Lymphocytes number were higher in O₂ (1.08±0.07) and OVA+O₂ (0.97±0.08) compared to CG (0.43±0.02). When the animals were exposed to oxygen and ovalbumin, concomitantly (OVA+O₂ - 4.55±0.23), the hyperoxia decreases lymphocytes number when compared to OVA (4.55±0.23). The TNF-alpha content were higher in PBS (134.00±7.03), OVA (126.30±3.40), O₂ (141.60±6.08) and OVA+O₂ (129.60±5.05) when compared to CG (94.67±2.03). In lung sections, the hyperoxia increases interleukin-17 in airway epithelial cells, alveolar type II cells and alveolar macrophages after ovalbumin-induced lung inflammation. When the animals were exposed to oxygen and ovalbumin, concomitantly, the staining with IL17 were increase when compared to OVA (p<0.001).

Conclusions

Hyperoxia-induced oxidative stress increases IL17 in airway epithelial cells, alveolar type II cells and alveolar macrophages after ovalbumin-induced lung inflammation.

Authors' details

¹Universidade Federal De Juiz De Fora, Brazil. ²Federal University of Ouro Preto (UFOP), Brazil.

¹Universidade Federal De Juiz De Fora, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Aarestrup et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA III

Immunity, Inflammation and Disease

Open Access

ORIGINAL RESEARCH

Hyperoxia promotes polarization of the immune response in ovalbumin-induced airway inflammation, leading to a TH₁₇ cell phenotypeAkinori C. Nagato¹, Frank S. Bezerra², André Talvani³, Beatriz J. Aarestrup¹, & Fernando M. Aarestrup¹¹Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Center for Reproductive Biology—CRB, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil²Laboratory of Metabolic Biochemistry (LBM)³Laboratory of Immunobiology of Inflammation, Department of Biological Sciences (DECBI), Center of Research in Biological Sciences (NUPEB), Federal University of Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil**Keywords**

Airway inflammation, hyperoxia, immune response, mice

Correspondence

Prof. Fernando Monteiro Aarestrup, PhD,
 Laboratory of Immunopathology and
 Experimental Pathology, Center for
 Reproductive Biology—CRB, Federal University
 of Juiz de Fora—Federal University of Juiz de
 Fora, s/n Jose Lourenco Kelmer Street,
 University Campus, Sao Pedro District, Juiz de
 Fora, MG 36036-900, Brazil. Tel.: +55 32
 8812-0350; Fax: +55 32 2102-3251;
 E-mail: fmaarestrup@hotmail.com

Funding information:

This work was supported by grants from Rede
 Mineira de Bioterismo/FAPEMIG 31/11,
 TOXIFAR 26/11, and CNPq. ACN received a
 bursary from CAPES. ACN was supported by
 the Visiting Professor Program from
 SUPREMA—School of Medical Sciences and
 Health of Juiz de Fora, Minas Gerais and USS—
 Severino Sombra University of Vassouras-RJ.

Received: 14 April 2015; Revised: 16 May
 2015; Accepted: 19 May 2015
 Final version published online 18 June 2015.

Immunity, Inflammation and Disease
 2015; 3(3): 321–337

doi: 10.1002/iid3.71

Abstract

Previous studies have demonstrated that hyperoxia-induced stress and oxidative damage to the lungs of mice lead to an increase in IL-6, TNF- α , and TGF- β expression. Together, IL-6 and TGF- β have been known to direct T cell differentiation toward the TH₁₇ phenotype. In the current study, we tested the hypothesis that hyperoxia promotes the polarization of T cells to the TH₁₇ cell phenotype in response to ovalbumin-induced acute airway inflammation. Airway inflammation was induced in female BALB/c mice by intraperitoneal sensitization and intranasal introduction of ovalbumin, followed by challenge methacholine. After the methacholine challenge, animals were exposed to hyperoxic conditions in an inhalation chamber for 24 h. The controls were subjected to normoxia or aluminum hydroxide dissolved in phosphate buffered saline. After 24 h of hyperoxia, the number of macrophages and lymphocytes decreased in animals with ovalbumin-induced airway inflammation, whereas the number of neutrophils increased after ovalbumin-induced airway inflammation. The results showed that expression of Nrf2, iNOS, T-bet and IL-17 increased after 24 of hyperoxia in both alveolar macrophages and in lung epithelial cells, compared with both animals that remained in room air, and animals with ovalbumin-induced airway inflammation. Hyperoxia alone without the induction of airway inflammation lead to increased levels of TNF- α and CCL5, whereas hyperoxia after inflammation lead to decreased CCL2 levels. Histological evidence of extravasation of inflammatory cells into the perivascular and peribronchial regions of the lungs was observed after pulmonary inflammation and hyperoxia. Hyperoxia promotes polarization of the immune response toward the TH₁₇ phenotype, resulting in tissue damage associated with oxidative stress, and the migration of neutrophils to the lung and airways. Elucidating the effect of hyperoxia on ovalbumin-induced acute airway inflammation is relevant to preventing or treating asthmatic patients that require oxygen supplementation to reverse the hypoxemia.

ANEXO E – PRODUÇÃO CIENTÍFICA IV

J Pediatr (Rio J). 2013;89(3):300-306



Jornal de
Pediatria

www.jpmed.com.br



ARTIGO ORIGINAL

Alterations in the pulmonary histoarchitecture of neonatal mice exposed to hyperoxia[☆]

Renata B. Reis^a, Akinori C. Nagato^b, Clarissa R. Nardeli^c, Isadora C.P. Matias^c, Wanderson G. Lima^d, Frank S. Bezerra^{e,*}

^aAcadêmica. Curso de Fisioterapia, Laboratório de Biomorfologia e Patologia Experimental, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Severino Sombra (USS), Vassouras, RJ, Brasil

^bMestre em Ciências. Professor-assistente, Laboratório de Biomorfologia e Patologia Experimental, Centro de Ciências da Saúde, USS, Vassouras, RJ, Brasil

^cAcadêmica. Curso de Biomedicina, Laboratório de Biomorfologia e Patologia Experimental, Centro de Ciências da Saúde, USS, Vassouras, RJ, Brasil

^dDoutor em Patologia. Professor Adjunto, Laboratório de Imunopatologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brasil

^eDoutor em Ciências Morfológicas. Professor Adjunto, Laboratório de Medicina Metabólica, Departamento de Ciências Biológicas, UFOP, Ouro Preto, MG, Brasil

Recebido em 10 de setembro de 2012; aceito em 29 de outubro de 2012

KEYWORDS

Hyperoxia;
Lung;
Newborn animals

Abstract

Objectives: To analyze the effects of exposure to hyperoxia (100% oxygen) on the lung histoarchitecture of neonatal mice.

Methods: Neonatal Balb/c mice were exposed to hyperoxia (HG) (100% oxygen) (n = 10) in a chamber (15 x 20 x 30 cm) for 24 hours with a flow of 2 L/min. The control group (CG) (n = 10) was exposed to normoxia in the same type of chamber and for the same time. After exposure, the animals were euthanized by decapitation; the lungs were removed and processed for histological examination according to the laboratory routine. Three-mm thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The morphometric analysis was performed with in order to analyze the macrophages present in the alveolar lumen, surface density (S_v) of gas exchange, volume density (V_v) of lung parenchyma, and areas of atelectasis.

Results: A decrease in the number of alveolar macrophages ($M\emptyset$) was observed in the HG (HG = 0.08 ± 0.01 $M\emptyset/mm^2$, CG = 0.18 ± 0.03 $M\emptyset/mm^2$, $p = 0.0475$), S_v of gas exchange

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2012.10.003>

*Como citar este artigo: Reis RB, Nagato AC, Nardeli CR, Matias IC, Lima WG, Bezerra FS. Alterations in the pulmonary histoarchitecture of neonatal mice exposed to hyperoxia. J Pediatr (Rio J). 2013;89:300-6.

*Autor para correspondência.

E-mail: frank@iceb.ufop.br (F.S. Bezerra).