

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

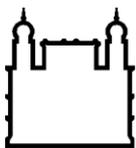
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
REMODELAMENTO DAS VIAS AÉREAS EM MODELOS MURINOS
DE INFLAMAÇÃO PULMONAR**

DANIELLA BIANCHI REIS INSUELA

Rio de Janeiro

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELLA BIANCHI REIS INSUELA

Efeito do glucagon sobre a resposta inflamatória e remodelamento das vias aéreas em modelos murinos de inflamação pulmonar

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Imunologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

RIO DE JANEIRO

2017

i

Insuela, Daniella Bianchi Reis .

EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E REMODELAMENTO DAS VIAS AÉREAS EM MODELOS MURINOS DE INFLAMAÇÃO PULMONAR / Daniella Bianchi Reis Insuela. - Rio de Janeiro, 2017.

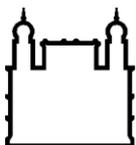
170 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Vinicius de Frias Carvalho.

Bibliografia: f. 114-126

1. Glucagon. 2. Asma. 3. Síndrome do desconforto respiratório agudo. 4. Linfócitos T. 5. Neutrófilos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DANIELLA BIANCHI REIS INSUELA

**EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
REMODELAMENTO DAS VIAS AÉREAS EM MODELOS MURINOS DE
INFLAMAÇÃO PULMONAR**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

APROVADA EM: 13/06/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida- Presidente
Prof. Dra. Claudia Farias Benjamim
Prof. Dr. Rodrigo Soares Fortunato
Prof. Dra. Tatiana Maron Gutierrez
Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane

Rio de Janeiro, 13 de junho de 2017

À minha família,

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, família, amigos, e oportunidade de estudar;

À minha mãe, Patricia, por tudo que ela fez e ainda faz por mim, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando, aconselhando e sempre cuidando com muito carinho e amor de mim. Sem ela eu não chegaria em lugar nenhum;

Ao meu pai, José Luís, que sempre me deu todo o apoio, carinho, amor e compreensão e que se estivesse vivo com certeza estaria orgulhoso e feliz por eu ter percorrido essa etapa acadêmica;

À minha irmã, Julia, pelo apoio, incentivo, carinho, amor, torcida e pelo exemplo de se dedicar para alcançar o que deseja profissionalmente;

Aos meus avôs, José Maria e Rosa Bianchi, por todo amor, dedicação, e por tudo que fizeram por mim quando estavam vivos;

À minha avó, Rosa Insuela, por todo carinho, preocupação, amor e por estar presente na minha caminhada até hoje;

Aos meus tios, Hilmar Júnior, Valéria e Júlio, por todo carinho que cuidam de mim e pela torcida para que eu seja realizada profissionalmente;

Às minhas madrinhas, Zelia, Dalila e Nelma e aos meus padrinhos Jorge e Dinho, por estarem sempre ao meu lado, me amparando, aconselhando, incentivando e acreditando em mim;

Às minhas amigas dos tempos de colégio (G9), especialmente Adriana Menucci e Silvia Helena, que apesar de terem seguido caminhos profissionais diferentes, continuam a ser verdadeiras amigas e sempre me apoiam e acreditam em mim;

Às grandes amizades que fiz na UNIRIO, especialmente Ricardo, Marcão e Bernardo, que sempre estiveram ao meu lado, não só nos momentos de estudo e diversão e que continuam tendo o mesmo carinho, amizade e preocupação comigo mesmo nós não convivendo mais todo dia;

Aos meus amigos-irmãos que fiz no Laboratório de Inflamação da Fiocruz, Jéssika, Rafael, Tássia, Nathália Magalhães, Diego e Tati Paula, por toda amizade, carinho, incentivo, apoio, risadas, broncas e compreensão;

A todos do Laboratório de Inflamação da Fiocruz, pelo carinho com que fui recebida e por todo apoio ao longo da realização desse trabalho, principalmente aos amigos Lívia, Davidson, Priscilla Olsen, Caio, Yago Sá, Maria Talita, Amanda, Fernanda e Dadá que sempre estiveram ao meu lado;

À Carolina Azevedo pela amizade e por ter me ensinado e por sempre ter me ajudado com os experimentos de linfócitos T;

Ao Maxi por toda a ajuda com os experimentos de células PMNs, pela paciência em me ensinar desde coisas básicas no laboratório até geografia, por todo apoio, carinho, compreensão, amizade e incentivo. Melhor do que ser um amigo no *facebook*, obrigada por ser meu companheiro de bancada;

Ao Dr. Marco Aurélio Martins, Dr. Renato Cordeiro e a Dra. Patrícia Silva, por terem me aceitado no laboratório, pelos ensinamentos, carinho, incentivo e pelo exemplo de pesquisadores bem sucedidos;

À Dra. Tatiana Maron Gutierrez por ter aceitado carinhosamente ser a revisora deste trabalho e ser membro integrante da banca examinadora;

Ao Dr. Vinicius Cotta de Almeida e Dr. Rodrigo Soares Fortunato e à Dra. Cláudia Farias Benjamim, por gentilmente terem aceitado o convite para integrarem a banca examinadora e pelas contribuições a esta tese;

Ao Dr. Júlio Beltrame Daleprane por ter me ensinado a técnica de *Western blot* e principalmente por ter me mostrado que além dessa técnica ser muito útil também pode ser prazerosa e também por ter aceito o convite de ser suplente da banca;

À Dra. Adriana Ribeiro pela colaboração com os dados aqui obtidos e por todo apoio ao longo dessa caminhada desde a iniciação científica;

À Dra. Magda Serra, por todos os ensinamentos, apoio, ajuda, companheirismo e sem esquecer as caronas;

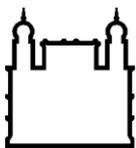
À Dra. Luciana Coelho pela paciência e carinho com que me ensinou a técnica do sistema de órgão isolado;

À Ana Carolina Arantes, Daiana, Joyce, Andrey, Camila, Jorginho, Thais, Ana Lúcia e Dra. Andressa Bernardi pelo suporte técnico na histologia, plestismografia barométrica invasiva, Elisa e *western blot*;

Ao meu orientador Dr. Vinicius Carvalho, pela dedicação, compreensão, paciência, amizade, apoio, ajuda, ensinamentos, confiança e excelente orientação desde a iniciação científica. Obrigada por sempre estar presente e por sempre me incentivar, acreditar em mim e não deixar eu desistir nem desanimar, o que era difícil em alguns momentos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado;

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Fiocruz pela oportunidade da realização desse doutorado e pelo apoio financeiro a ida de Congressos internacionais.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DO GLUCAGON SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E REMODELAMENTO DAS VIAS AÉREAS EM MODELOS MURINOS DE INFLAMAÇÃO PULMONAR

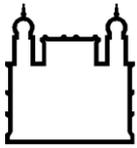
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Daniella Bianchi Reis Insuela

Introdução: Glucagon é um hormônio hiperglicêmico cuja expressão do receptor (GcgR) foi detectada em pulmões, porém pouco se sabe sobre os efeitos desse hormônio nesse órgão. Neste trabalho, investigamos o efeito do glucagon sobre a contração do músculo liso e inflamação das vias aéreas em modelos murino de LPA/SDRA e asma. **Metodologia:** O efeito do glucagon (0,1 ou 1 μ M) sobre a contração de traqueias induzida pelo carbacol foi medido num sistema de órgão isolado. Algumas traqueias receberam antagonista do receptor do glucagon (des-His1-[Glu9]-glucagon-amida; 1 μ M) ou inibidores de adenilato ciclase (AC) (SQ 22,536; 5 μ M), NOS (L-NAME; 100 μ M), COX-1 (SC-560; 1 μ M) ou COX-2 (NS-398; 0,03 μ M), ou tiveram seu epitélio removido antes da exposição ao glucagon *in vitro*. O efeito do glucagon (0,1 – 10 μ g/Kg, i.n.) sobre a broncoconstrição provocada pela metacolina em camundongos foi testado utilizando pletismografia invasiva. Em alguns experimentos, foram administrados L-NAME (20 mg/Kg) ou SC-560 (5 mg/Kg) i.p. antes do glucagon. A expressão de CREB, fCREB, NOS-3, fNOS-3, COX-1 e TCR $\alpha\beta$ foi avaliada por *Western blot* e a do GcgR foi analisada por citometria de fluxo. PGE₂ foi quantificada por *EIA*. A ação do glucagon (1-10 μ g/Kg, i.n.) sobre a hiper-reatividade e inflamação das vias aéreas induzidas pelo LPS ou ovoalbumina, ambos 25 μ g/25 μ L i.n., foi testada por pletismografia invasiva, lavado broncoalveolar (BAL) e quantificação de citocinas por ELISA. No modelo da ovoalbumina análises histológicas avaliaram o infiltrado leucocitário e a deposição de matriz extracelular nos pulmões e a citometria de fluxo quantificou linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL e linfonodos mediastinais. O efeito do glucagon (0,03 – 3 μ M) sobre a quimiotaxia de polimorfonucleares humanos induzida por IL-8 *in vitro* foi investigado num espectrofotômetro. A ação do glucagon (0,03 - 30 μ M) sobre a proliferação e ativação de linfócitos T *in vitro* foi avaliada por citometria de fluxo. **Resultados:** Glucagon impediu a contração traqueal induzida pelo carbacol *in vitro*. Esse efeito do glucagon foi abolido pela remoção epitelial e pelo bloqueio do GcgR, AC, NOS ou COX-1. Glucagon impediu a broncoconstrição provocada pela metacolina, num mecanismo sensível ao L-NAME e SC-560. Glucagon aumentou a fosforilação de CREB e NOS-3 e os níveis de PGE₂ nos pulmões, sem alterar a expressão de COX-1. Glucagon impediu a hiper-reatividade e a inflamação das vias aéreas induzidas pelo LPS ou ovoalbumina. Glucagon preveniu o aumento na expressão do TCR $\alpha\beta$, no número de eosinófilos, na deposição de matriz extracelular nos pulmões e no número de TCD4⁺ e TCD8⁺ promovida pela ovoalbumina. As células polimorfonucleares expressaram o GcgR e o glucagon impediu a quimiotaxia dessas células *in vitro*. Glucagon reduziu a ativação e proliferação de células T estimuladas com anti-CD3 ou ovoalbumina *in vitro*. **Conclusão:** Esses resultados mostram uma atividade anti-espasmódica do glucagon nas vias aéreas que é mediada pelo aumento na ativação de NOS-3 e COX-1 com consequente liberação de NO e PGE₂ pelo epitélio. Além disso, mostram um efeito anti-inflamatório do glucagon em modelos de LPA/SDRA e asma, que possivelmente está relacionado com a modulação de neutrófilos e linfócitos T, respectivamente.

Palavras-chave: Asma; Glucagon; Linfócito T; Músculo liso; Neutrófilo; Síndrome do desconforto respiratório agudo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT OF GLUCAGON ON INFLAMMATORY RESPONSE AND REMODELING OF AIRWAYS IN MURINE MODELS OF PULMONARY INFLAMMATION

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Daniella Bianchi Reis Insuela

Introduction: Glucagon is a hyperglycemic hormone whose receptor expression (GcgR) has been detected in the lungs, but little is known about the effects of this hormone on this organ. In this work, we investigated the effect of glucagon on smooth muscle contraction and airway inflammation in murine models of ALI/ARDS and asthma. **Methods:** The effect of glucagon (0.1 or 1 μ M) on the contraction of trachea induced by carbachol was measured in an isolated organ system. Some tracheas received glucagon receptor antagonist (des-His1- [Glu9] -glucagon-amide, 1 μ M) or adenylate cyclase (AC) (SQ 22,536; 5 μ M), NOS (L-NAME, 100 μ M), COX-1 (SC-560; 1 μ M) or COX-2 (NS-398; 0.03 μ M) inhibitors or had their epithelium removed before exposure to glucagon *in vitro*. The effect of glucagon (0.1 - 10 μ g/kg, i.n.) on bronchoconstriction provoked by methacholine in mice was tested using invasive plethysmography. In some experiments was administered L-NAME (20 mg / Kg) or SC-560 (5 mg/kg) i.p. before glucagon. The expression of CREB, pCREB, NOS-3, pNOS-3, COX-1 and TCR $\alpha\beta$ was evaluated by Western blot and the GcgR was analyzed by flow cytometry. PGE₂ was quantified by EIA. The action of glucagon (1-10 μ g / Kg, in) on airway hyperreactivity and inflammation induced by LPS or ovalbumin, both 25 μ g/25 μ L i.n., was tested by invasive plethysmography, bronchoalveolar lavage (BAL) and ELISA. In the ovalbumin model, histological analyzes evaluated leukocyte infiltrate and extracellular matrix deposition in the lungs and flow cytometry quantified TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes in BAL and mediastinal lymph nodes. The effect of glucagon (0.03 - 3 μ M) on human polymorphonuclear chemotaxis induced by IL-8 *in vitro* was investigated in a spectrophotometer. The action of glucagon (0.03 - 30 μ M) on the proliferation and activation of T lymphocytes *in vitro* was evaluated by flow cytometry. **Results:** Glucagon prevented tracheal contraction induced by carbachol *in vitro*. This effect of glucagon was abolished by epithelial removal and GcgR, AC, NOS, or COX-1 blockade. Glucagon prevented the bronchoconstriction provoked by methacholine in a mechanism sensitive to L-NAME and SC-560. Glucagon increased the phosphorylation of CREB and NOS-3 and PGE₂ levels in the lungs without altering COX-1 expression. Glucagon prevented hyperreactivity and inflammation of airways induced by LPS or ovalbumin. Glucagon prevented the increase in TCR $\alpha\beta$ expression, number of eosinophils, deposition of extracellular matrix in the lungs and number of TCD4⁺ and TCD8⁺ promoted by ovalbumin. Polymorphonuclear cells expressed GcgR and glucagon prevented the chemotaxis of these cells *in vitro*. Glucagon reduced the activation and proliferation of T cells stimulated with anti-CD3 or ovalbumin *in vitro*. **Conclusion:** These results show an anti-spasmodic activity of glucagon in the airways which is mediated by the increase in activation of NOS-3 and COX-1 with consequent release of NO and PGE₂ by the epithelium. In addition, they show an anti-inflammatory effect of glucagon in ALI/ARDS and asthma models, which is possibly related to the modulation of neutrophils and T lymphocytes, respectively.

Keywords: Asthma; Glucagon; T lymphocyte; Smooth muscle; Neutrophil; Acute respiratory distress syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – *Arachidonic Acid* – Ácido Araquidônico
AC – *Adenylate Cyclase* – Adenilato Ciclase
ACh – *Acetylcholine* – Acetilcolina
AChE – *Acetylcholinesterase* – Acetilcolinesterase
ATCH – *Adrenocorticotropic Hormone* – Hormônio Adrenocorticotrófico
AEC – *Aminoethyl Carbazole* – Aminoetilcarbazol
AHS – *Albumin Human Serum* – Albumina Sérica Humana
AMPc – *Cyclic Adenosine Monophosphate* – Monofosfato de Adenosina Cíclico
ANOVA – *Analysis of Variance* – Análise de Variância
APC – *Allophycocyanin* – Aloficocianina
AUC – *Area Under the Curve* – Área Sob a Curva
BAL – *Bronchoalveolar Lavage* – Lavado Broncoalveolar
BCA – *Bicinchoninic Acid* – Ácido Bicincônico
BK_{Ca} – *Large-Conductance Calcium-Activated Potassium* – Canais Para Potássio De Alta Condutância Ativados Por Ca⁺²
BSA – *Bovine Serum Albumin* – Albumina de Soro Bovino
Calceína AM – *Calcein Acetomethoxy* – Acetometoxi da Calceína
CAT – *Choline Acetyltransferase* – Colina-Acetiltransferase
CBA – *Cytometric Bead Array*
CPT – Capacidade Pulmonar Total
C_{dyn} – *Dynamic Lung Compliance* – Complacência Pulmonar Dinâmica
CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratórios
COX – *Cyclooxygenase* – Ciclooxygenase
CREB – *cAMP-Response Element Binding Protein* – Proteína Ligante ao Elemento de Resposta ao AMPc
DAG – *Diacylglycerol* – Diacilglicerol
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Meio *Eagle* Modificado por Dulbecco
DMSO – *Dimethyl Sulfoxide* – Dimetilsulfóxido
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DPP4 – *Dipeptidyl Peptidase-4* – Dipeptidil Peptidase-4
EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EIA – *Enzyme Immunoassay* – Ensaio Imunoenzimático
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
Emax – *Maximal Contractile Response* – Resposta Contrátil Máxima
Eot – *Eotaxin* – Eotaxina
EPM – Erro Padrão da Média
EPO – *Eosinophil Peroxidase* – Peroxidase Eosinofílica
FcεRI – *High Affinity IgE Receptor* – Receptor de Alta Afinidade para IgE
FITC – *Fluorescein Isothiocyanate* – Fluoresceína Isotiocinato
GcgR – *Glucagon Receptor* – Receptor do Glucagon
GCs – *Soluble Guanylate Cyclase* – Guanilato Ciclase Solúvel
GLP – *Glucagon-Like Peptide* – Peptídeo Semelhante ao Glucagon
GM-CSF – *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GRK – *G Protein Coupled Receptor Kinase* – Cinase dos Receptores Acoplados a Proteína G
GRPP – *Glicentin-Related Pancreatic Polypeptide* – Polipeptídeo Pancreático Relacionado com a Glicentina
GTP – *Guanosine Triphosphate* – Trifosfato de Guanosina

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution* – Solução Salina Balanceada de Hanks
 Ig – *Immunoglobulin* – Imunoglobulina
 IL – *Interleucin* – Interleucina
 IP3 – *Inositol 1,4,5-Trisphosphate* – Inositol 1,4,5 trifosfato
 L-NAME – *N^o-Nitro-L-Arginine Methyl Ester* – N^o-Nitro-L-Arginina Metil Ester
 LPA – Lesão Pulmonar Aguda
 LPS – *Lipopolysaccharide* – Lipopolissacarídeo
 MEC – Matriz Extracelular
 MFI – *Mean Fluorescence Intensity* – Média da Intensidade de Fluorescência
 MG – Miniglucagon
 MIP-2 – *Macrophage Inflammatory Protein-2* – Proteína Inflamatória de Macrófagos-2
 MLC – *Regulatory Myosin Light Chain* – Cadeia Leve Reguladora da Miosina
 MLCK – *Myosin Light Chain Kinase* – Cinase da Cadeia Leve de Miosina
 MLCP – *Myosin Light Chain Phosphatase* – Fosfatase da Cadeia Leve de Miosina
 NK – *Natural Killer*
 NO – *Nitric Oxide* – Óxido Nítrico
 NOS – *Nitric Oxide Synthase* – Óxido Nítrico Sintase
 OVA – *Ovalbumin* – Ovoalbumina
 PACAP – *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide* – Polipeptídeo Ativador da Adenilato-Ciclase Pituitária
 PAS – *Periodic Acid-Schiff* – Ácido Periódico de Schiff
 PBS – *Phosphate Buffered Saline* – Solução Salina Tamponada com Fosfato
 PC – *Prohormone Convertase* – Pró-hormônio Convertase
 pCREB – *Phospho CREB* – CREB Fosforilado
 pNOS-3 – *Phospho NOS-3* – NOS-3 Fosforilada
 PE – *Phycoerythrin* – Ficoeritrina
 PE-Cy5 – *Phycoerythrin Cyanin 5* – Ficoeritrina-Cianina 5
 pEC50 – *Negative Logarithm of the Agonist Concentration that Produces 50% of the Maximal Effect* – Logaritmo Negativo da Concentração do Agonista que produz 50% do Efeito Máximo
 PEEP – *Positive End-Expiratory Pressure* – Pressão Positiva Expiratória Final
 PGE₂ – *Prostaglandin E₂* – Prostaglandina E₂
 PGG₂ – *Prostaglandin G₂* – Prostaglandina G₂
 PGH₂ – *Prostaglandin H₂* – Prostaglandina H₂
 PGI₂ – *Prostacyclin* – Prostaciclina
 PI – *Propidium Iodide* – Iodeto de Propídeo
 PKA – *Protein Kinase A* – Proteína Cinase A
 PKC – *Protein Kinase C* – Proteína Cinase C
 PKG – *Protein Kinase G* – Proteína Cinase G
 PLC – *Phospholipase C* – Fosfolipase C
 PMN – *Polymorphonuclear* – Polimorfonuclear
 Proteína Gi – *Inhibitory G Protein* – Proteína G inibitória
 Proteína Gq – *Quiescent G Protein* – Proteína G quiescente
 Proteína Gs – *Stimulatory G Protein* – Proteína G estimulatória
 PSA – Persulfato de Amônio
 QSP – Quantidade Suficiente Para
 Raw – *Airway Resistance* – Resistência das Vias Aéreas
 RE – Reticulo Endoplasmático
 RL – *Lung Resistance* – Resistência Pulmonar
 RNS – *Reactive Nitrogen Species* – Espécies Reativas de Nitrogênio
 ROS – *Reactive Oxygen Species* – Espécies Reativas de Oxigênio
 Rti – *Tissue Resistance* – Resistência Tecidual

SCF – *Stem cell factor* – Fator de Células-Tronco
SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDS- PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide* – Dodecil Sulfato de Sódio de Poliacrilamida
SFB – Soro Fetal Bovino
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SOC – *Store-Operated Calcium Channel* – Canal de Ca^{+2} operado por armazenamento
TBST – *Tris Buffered Saline-Tween20* – Tampão Tris Salina Tween 20
Temed – *Tetramethylethylenediamine* – Tetrametiletilenodiamina
TGF- β – *Transforming Growth Factor-Beta* – Fator de Transformação do Crescimento-Beta
Th – *T Helper* – T auxiliar
TNF- α – Tumor Necrosis Factor-Alpha – Fator de Necrose Tumoral-Alfa
TSLP – *Thymic stromal lymphopoietin* – Linfopoetina do Estroma Tímico
VIP – *Vasoactive Intestinal Peptide* – Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE SÍMBOLOS

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
CH₃COONa.3H₂O – Acetato de Sódio
CO – Monóxido de Carbono
CO₂ – Dióxido de Carbono
C₃H₇NO – N,N-dimetilformamida
HCOH – Formaldeído
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
KCl – Cloreto de potássio
KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio Monobásico
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
NaCl – Cloreto de Sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio
Na₂HPO₄ – Fosfato de Sódio Dibásico Anidro
NaH₂PO₄ – Fosfato de Sódio Monobásico
NaH₂PO₄.H₂O – Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado
NaOH – Hidróxido de Sódio
O₂ – Gás Oxigênio

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1.1 - Diferenças na estrutura da árvore traqueobrônquica e dos pulmões entre o ser humano e o camundongo.....	4
Tabela 4.1 - Glucagon inibe a resposta contrátil máxima (E _{max}) mas não a potência (pEC ₅₀) do carbacol (10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁴ M) em traqueais de camundongos A/J.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 - Árvore traqueobrônquica do ser humano.....	3
Figura 1.2 - Fatores envolvidos na fisiopatologia da LPA/SDRA.....	15
Figura 1.3 - A história natural da LPA/SDRA inclui resolução e reparo versus persistência e progressão.....	16
Figura 1.4 - Resposta inflamatória na fisiopatologia da asma.....	20
Figura 1.5 - Remodelamento das vias aéreas na asma.....	22
Figura 1.6 - Expressão e efeitos do GcgR em vários órgãos e tecidos do organismo.....	24
Figura 1.7 - Glucagon modula a função e número de células estruturais e inflamatórias.....	28
Figura 3.1 - Protocolo experimental da indução de LPA/SDRA em camundongos A/J e esquema de tratamento com glucagon.....	42
Figura 3.2 - Protocolo experimental da indução de asma aguda em camundongos A/J e esquema de tratamento com glucagon.....	43
Figura 4.1 - Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueias de camundongos A/J induzida por carbacol <i>in vitro</i>	54
Figura 4.2 - Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueias induzida por carbacol <i>in vitro</i> é dependente da ativação do GcgR.....	56
Figura 4.3 - Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração traqueal promovida pelo carbacol <i>in vitro</i> depende da ativação do epitélio e necessita dos metabólitos de NOS e COX-1, mas não dos produtos de COX-2.....	58
Figura 4.4 - Administração de glucagon impede a contração da musculatura lisa das vias aéreas promovida pela metacolina <i>in vivo</i>	61
Figura 4.5 - Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a redução da função respiratória induzida pela metacolina <i>in vivo</i> depende da produção de NO.....	62
Figura 4.6 - Produtos da ativação de COX-1 estão envolvidos no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a redução da função respiratória induzida pela metacolina <i>in vivo</i>	63
Figura 4.7 - Glucagon aumenta a atividade de CREB, NOS-3 e COX-1 em pulmões de camundongos A/J.....	64
Figura 4.8 - Inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas induzidas pelo LPS são sensíveis ao tratamento com glucagon.....	67
Figura 4.9 - GcgR é expresso em PMNs isolados de sangue humano e o glucagon é capaz de impedir a migração desses PMNs induzida por IL-8 <i>in vitro</i> sem interferir na viabilidade dessas células.....	68

Figura 4.10 - Glucagon não impede a secreção de IL-8 induzida pelo LPS em células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 <i>in vitro</i>	69
Figura 4.11 - Animais asmáticos apresentam aumento na expressão do GcgR nos pulmões.....	72
Figura 4.12 - Animais asmáticos apresentam aumento no número de células que expressam o GcgR no BAL e no linfonodo mediastinal.....	73
Figura 4.13 - Glucagon impede o acúmulo de leucócitos no BAL em modelo murino de asma aguda.....	74
Figura 4.14 - Glucagon impede o aumento da atividade de EPO e o infiltrado eosinofílico nos pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA.....	75
Figura 4.15 - Tratamento com glucagon previne o aumento dos níveis de citocinas em pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA.....	76
Figura 4.16 - Glucagon não apresenta efeito na liberação de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com IL-13 <i>in vitro</i>	78
Figura 4.17 - Glucagon impede o aumento da expressão do TCR $\alpha\beta$ em pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA.....	81
Figura 4.18 - Glucagon impede a elevação do número de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ no BAL e linfonodo mediastinal de camundongos A/J desafiados com OVA.....	82
Figura 4.19 - Glucagon impede a redução na expressão de GcgR em células TCD4 ⁺ mas não impede o aumento dos níveis de GcgR em linfócitos TCD8 ⁺ no BAL de camundongos A/J desafiados com OVA.....	83
Figura 4.20 - Glucagon impede a elevação dos níveis de GcgR em linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ no linfonodo mediastinal de camundongos A/J desafiados com OVA.....	84
Figura 4.21 - Glucagon reduz a resposta proliferativa de linfócitos T ativados com anti-CD3 <i>in vitro</i>	87
Figura 4.22 - Glucagon impede a secreção de citocinas pelos linfócitos T ativados com anti-CD3 <i>in vitro</i>	88
Figura 4.23 - Glucagon impede o aumento da proliferação de linfócitos T ativados com OVA <i>in vitro</i> e inibe a elevação percentual da população de linfócitos TCD4 ⁺	89
Figura 4.24 - Administração de glucagon impede a hiper-reatividade das vias aéreas a metacolina induzida pela OVA.....	91
Figura 4.25 - Glucagon impede a fibrose subepitelial nos pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA.....	93
Figura 4.26 - Glucagon não é capaz de impedir a proliferação de fibroblastos pulmonares induzida por IL-13 <i>in vitro</i>	94

Figura 6.1 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas e na ação anti-inflamatória do glucagon nos modelos murino de LPA/SDRA e asma.....113

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
Lista de Símbolos.....	xi
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Figuras.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Sistema Respiratório.....	1
1.1.1. Músculo liso das vias aéreas.....	5
1.2. Doenças pulmonares.....	10
1.2.1. LPA/SDRA.....	11
1.2.2. Asma.....	16
1.3. Glucagon.....	23
1.3.1. Efeitos do glucagon na resposta inflamatória.....	26
1.4. Hipótese.....	29
2. Objetivos.....	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1. Animais.....	31
3.2. Voluntários saudáveis.....	31
3.3. Avaliação da contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	31
3.3.1. Sistema de banho de órgão isolado.....	31
3.3.2. Avaliação do efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	32

3.3.3. Avaliação dos mecanismos de ação associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia <i>in vitro</i>	32
3.4. Avaliação do efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina <i>in vivo</i>	33
3.5. <i>Western blot</i>	33
3.5.1. Obtenção e processamento das amostras.....	33
3.5.2. Quantificação de proteína totais pelo método do BCA.....	34
3.5.3. Separação das proteínas por eletroforese.....	35
3.5.4. Transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose.....	35
3.5.5. Bloqueio, imunodeteção e revelação.....	35
3.6. Quantificação de PGE ₂	36
3.7. Análise do efeito do glucagon sobre a ativação de células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 <i>in vitro</i>	37
3.8. Avaliação do efeito do glucagon sobre a quimiotaxia de polimorfonucleares humanos <i>in vitro</i>	37
3.8.1. Isolamento de células PMNs a partir de amostras de sangue.....	37
3.8.2. Quimiotaxia de PMNs <i>in vitro</i>	38
3.8.3. Ensaio de viabilidade dos PMNs tratados com glucagon <i>in vitro</i>	39
3.9. Análise da ação do glucagon sobre a proliferação, secreção de citocinas e população de linfócitos <i>in vitro</i>	39
3.10. Avaliação do efeito do glucagon sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	41
3.10.1. Cultura primária de fibroblastos pulmonares.....	41
3.10.2. Ensaio de proliferação de fibroblastos pulmonares <i>in vitro</i>	41
3.11. Modelos murinos de inflamação pulmonar.....	42
3.11.1. Modelo de LPA/SDRA.....	42
3.11.2. Modelo de Asma Aguda induzida por OVA.....	42
3.12. Avaliação do efeito do tratamento com glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas.....	43

3.13. Lavado broncoalveolar.....	44
3.14. Marcação das células obtidas do linfonodo mediastinal.....	44
3.15. Quantificação de citocinas nos pulmões.....	45
3.16. Ensaio da atividade da peroxidase eosinofílica no pulmão.....	45
3.17. Histologia.....	46
3.17.1. Imunohistoquímica.....	46
3.17.2. Análise do infiltrado celular no tecido pulmonar.....	47
3.17.3. Análise da deposição da matriz extracelular nas regiões peribronquiolares.....	48
3.18. Soluções.....	48
3.18.1. Solução final de Krebs.....	48
3.18.2. Solução de EDTA 100 mM.....	48
3.18.3. PBS 10 X.....	49
3.18.4. Tampão de amostra <i>SDS-PAGE</i>	49
3.18.5. Gel de corrida de poliacrilamida 10 %.....	49
3.18.6. Gel de empacotamento de poliacrilamida 4%.....	49
3.18.7. Tampão de corrida 10X.....	50
3.18.8. Tampão de transferência 1 X.....	50
3.18.9. Tampão TBS 10X.....	50
3.18.10. Tampão TBST.....	50
3.18.11. Solução salina balanceada de Hanks.....	50
3.18.12. Tampão de iodeto de propídeo.....	51
3.18.13. <i>Milloning</i>	51
3.18.14. AEC uso.....	51
3.18.15. Meio de montagem para imunohistoquímica.....	51
3.19. Drogas.....	52
3.20. Análise estatística.....	52

4. Resultados.....	53
4.1. Glucagon impede a contração da musculatura lisa de traqueias induzida por carbacol <i>in vitro</i> através da ativação do seu receptor (GcgR).....	53
4.2. Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa induzida por carbacol <i>in vitro</i> é dependente da ativação do epitélio e da liberação de NO e de produtos da ativação de COX-1.....	57
4.3. Glucagon impede a contração do músculo liso das vias aéreas induzida por metacolina <i>in vivo</i>	59
4.4. O efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração do músculo liso das vias aéreas induzida por metacolina <i>in vivo</i> depende da ativação de CREB e da produção de NO e PGE ₂	59
4.5. Glucagon impede inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas induzida por LPS.....	65
4.6. PMNs isolados de sangue humano expressam GcgR e são inibidos pelo glucagon de migrarem em resposta ao estímulo com IL-8 <i>in vitro</i>	65
4.7. Glucagon não impede a secreção de IL-8 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com LPS <i>in vitro</i>	66
4.8. Animais asmáticos apresentam aumento na expressão do GcgR nos pulmões, no BAL e no linfonodo mediastinal.....	70
4.9. Tratamento com glucagon impede inflamação das vias aéreas e do tecido pulmonar no modelo murino de asma aguda induzida por OVA.....	70
4.10. Glucagon não altera a secreção de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 induzida por IL-13 <i>in vitro</i>	77
4.11. Tratamento com glucagon impede o acúmulo de linfócitos T α/β promovido pelo desafio intranasal com OVA.....	79
4.12. Glucagon interfere na quantidade de GcgR expresso em células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ no BAL e linfonodo mediastinal que foi alterada pelo desafio intranasal com OVA.....	79
4.13. Glucagon inibe a ativação de linfócitos T estimulados com anti-CD3 ou OVA <i>in vitro</i>	85
4.14. Glucagon impede a hiper-reatividade das vias aéreas a metacolina no modelo murino de asma aguda induzida por OVA.....	90
4.15. Administração de glucagon previne a deposição de matriz extracelular peribronquiolar no modelo murino de asma aguda induzida por OVA.....	92
4.16. Glucagon não impede a proliferação de fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 <i>in vitro</i>	92

5. Discussão.....	95
6. Conclusão.....	112
7. Referências Bibliográficas.....	114
8. Anexos.....	127
8.1. Artigos publicados durante o doutorado.....	127
8.2. Artigo submetido durante o doutorado.....	127
8.3. <i>Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E2</i>	128
8.4. <i>Mangiferin Prevents Guinea Pig Tracheal Contraction via Activation of the Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway</i>	141

1. Introdução

1.1 Sistema respiratório

O sistema respiratório é o sistema responsável pela obtenção do gás oxigênio (O_2) do ambiente externo para que seja fornecido às células e pela remoção no organismo do dióxido de carbono (CO_2) produzido pelo metabolismo celular. Dessa forma, o sistema respiratório apresenta papel importante na manutenção da homeostase. Além da troca gasosa, o sistema respiratório desempenha outras funções como manutenção do equilíbrio ácido-base, defesa do organismo, fonação e produção de substâncias necessárias ao funcionamento normal do próprio sistema respiratório, como por exemplo, a síntese de surfactante pelos pulmões (1).

O sistema respiratório funcionalmente é constituído pela zona condutora e pela zona respiratória. A zona condutora é composta pelas cavidades nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais e, tem a função de conduzir o ar inalado até os locais onde são realizadas as trocas gasosas. A zona respiratória é formada pelos ductos alveolares e sacos alveolares e é a região onde ocorre a troca gasosa entre o sangue e o ar (2). Anatomicamente, o sistema respiratório é dividido em vias aéreas superiores e inferiores. As vias aéreas superiores são formadas por órgãos localizados fora da caixa torácica, o que inclui nariz, faringe e laringe. Já as vias aéreas inferiores consistem nos órgãos localizados na caixa torácica, o que corresponde a traqueia, brônquios e pulmões (3).

Apesar dessa arquitetura estrutural do sistema respiratório ser conservada nos mamíferos, existem importantes diferenças entre os componentes do sistema respiratório dos seres humanos e dos camundongos (4). Uma vez que nosso estudo foi realizado utilizando camundongos, é relevante a descrição de tais diferenças. Os seres humanos apresentam uma capacidade pulmonar total (CPT) de 6 L e possuem 3 lobos no pulmão direito e 2 lobos no pulmão esquerdo. Doze por cento do pulmão humano é constituído pelo parênquima e 1% pelas vias aéreas da árvore traqueobrônquica. Os camundongos possuem 1 mL de CPT e dispõem de 4 lobos no pulmão direito e apenas 1 lobo no pulmão esquerdo. O parênquima constitui 18% do pulmão dos camundongos e as vias aéreas da árvore traqueobrônquica ocupam 11% (5-7). Nos seres humanos, a árvore traqueobrônquica apresenta 23 gerações de ramificação dicotômica que se estende da traqueia (geração 0) até os sacos alveolares (geração 23) (Figura 1.1). Os ductos alveolares se originam de divisões dos bronquíolos respiratórios que por sua vez foram formados a partir dos bronquíolos terminais (3). A árvore traqueobrônquica dos camundongos é dividida num padrão monopodial e possui menos

gerações de ramificação do que a do ser humano, o que totaliza aproximadamente 13 a 17 gerações. Os camundongos não possuem bronquíolos respiratórios. No caso deles, os bronquíolos terminais dão origem diretamente aos ductos alveolares (7). Além disso, enquanto nos camundongos a cartilagem está presente apenas nas vias aéreas extra-pulmonares (traqueia até brônquios lobares), nos seres humanos a cartilagem se estende desde a traqueia até várias gerações bronquiolares (4). Outra importante diferença entre seres humanos e camundongos é que nos bronquíolos dos murinos não existe glândulas submucosas. Nesses roedores a principal célula secretora de muco é a célula de Clara (7) (Tabela 1.1).

Tanto nos seres humanos quanto nos camundongos o músculo liso está presente nas vias aéreas centrais e periféricas e forma bandas que envolvem circunferencialmente as vias aéreas num padrão helicoidal (8). As vias aéreas centrais são aquelas que apresentam diâmetro interno maior que 2 mm no seres humanos e maior que 500 μm nos camundongos. As vias aéreas periféricas são as vias aéreas cujo diâmetro interno é menor que 2 mm nos seres humanos e menor que 500 μm nos camundongos (9, 10). A espessura do músculo liso das vias aéreas em relação ao diâmetro do lúmen das mesmas aumenta para a periferia, mas em termos absolutos, a quantidade de músculo liso é menor nas vias aéreas periféricas (8). A diferença descrita para os seres humanos e camundongos quanto ao músculo liso das vias aéreas é que nos seres humanos o músculo liso das vias aéreas se estende até as primeiras gerações dos ductos alveolares. Já nos camundongos, o músculo liso das vias aéreas não ultrapassa as junções bronquíolo-ducto alveolar (11) (Tabela 1.1).

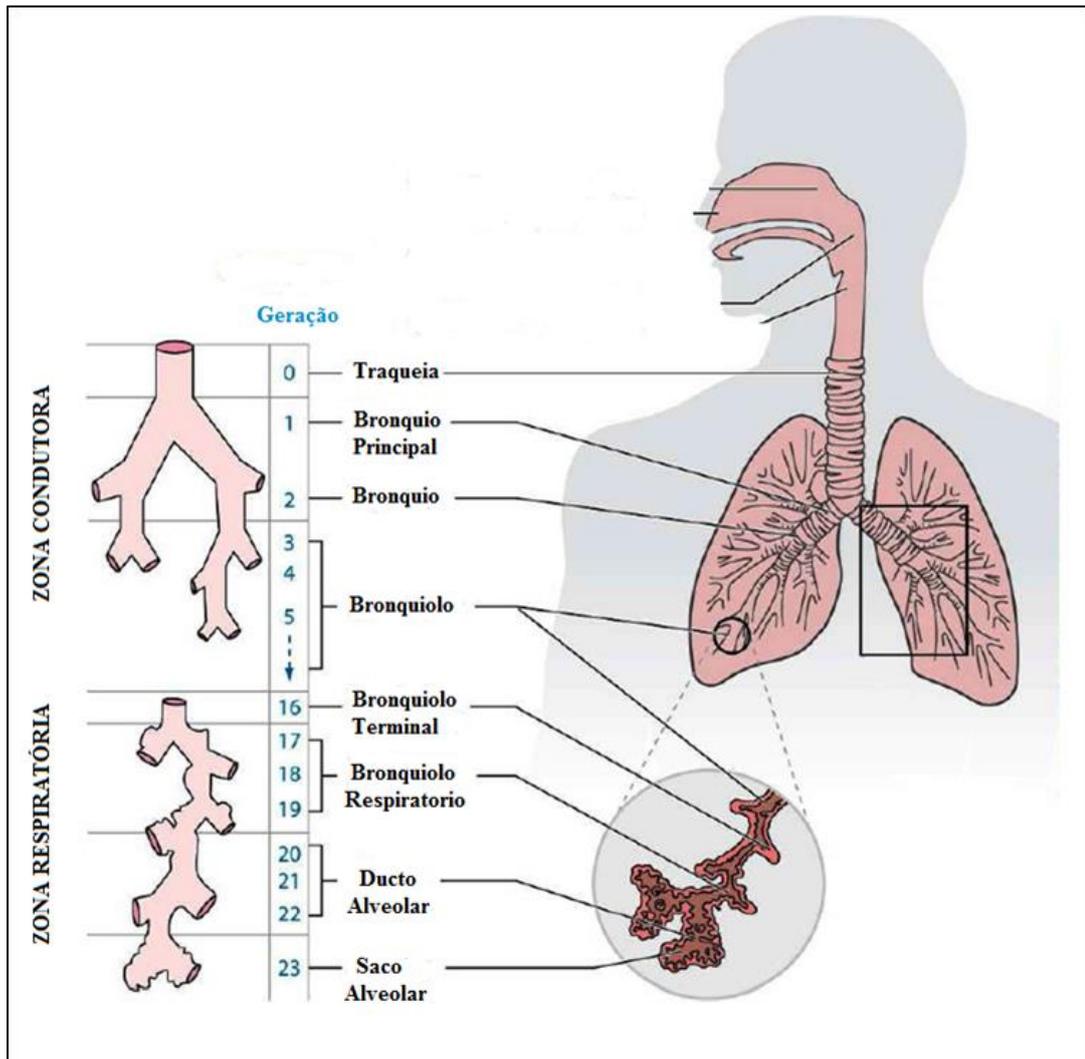


Figura 1.1 **Árvore traqueobrônquica do ser humano.** A árvore traqueobrônquica do ser humano se inicia na traqueia (geração 0) e termina nos sacos alveolares (geração 23). Diferente dos camundongos, no ser humano o bronquíolo principal se ramifica nos bronquíolos respiratórios e esses dão origem aos ductos alveolares. A traqueia, brônquios principais, brônquios, bronquíolos e bronquíolos terminais fazem parte da zona condutora do sistema respiratório. Os bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares constituem a zona respiratória do sistema respiratório. Modificado a partir de Hussan e cols. 2011 (12).

Tabela 1.1. Diferenças na estrutura da árvore traqueobrônquica e dos pulmões entre o ser humano e o camundongo.

	Seres humanos	Camundongos
Capacidade Pulmonar Total	6 L	1 mL
Anatomia dos lobos	3 Lobos no pulmão direito 2 Lobos no pulmão esquerdo	4 Lobos no pulmão direito 1 Lobos no pulmão esquerdo
% do pulmão ocupado pelo parênquima	12%	18%
% do pulmão ocupado pelas vias aéreas da árvore traqueobrônquica	1%	11%
Padrão de ramificação da árvore traqueobrônquica	Dicotômica	Monopodial
Gerações da árvore traqueobrônquica	23-25	13-17
Bronquíolos respiratórios	Sim	Não
Cartilagem nas paredes das vias aéreas	Traqueia até varias gerações bronquiolares	Traqueia até brônquios lobares
Glândulas submucosas bronquiolares	Sim	Não
Músculo liso das vias aéreas	Estende-se até os ductos alveolares	Estende-se até as junções bronquíolo-ducto alveolar

Modificado a partir de Hyde e cols. 2009 (7).

1.1.1 Músculo liso das vias aéreas

Ainda é desconhecido o papel do músculo liso das vias aéreas durante a homeostasia, porém é sugerido que devido a sua capacidade contrátil ele é importante para manter o tônus das vias aéreas, controlar a distribuição do fluxo de ar nos pulmões, modular o grau de compressão das vias aéreas durante a tosse e mediar a respiração profunda (8, 13).

Tanto a contração como o relaxamento do músculo liso das vias aéreas podem influenciar dois parâmetros importantes da mecânica respiratória: a resistência pulmonar (RL) e a complacência dinâmica pulmonar (C_{dyn}) (14, 15). A RL é definida como a oposição ao fluxo de ar no sistema respiratório e é subdividida em resistência das vias aéreas (R_{aw}) e resistência tecidual (R_{ti}). A R_{aw} é a dificuldade da passagem do ar nas vias aéreas e representa 80% da RL. A R_{aw} é obtida através da razão entre o gradiente de pressão necessário para levar o ar do ambiente até os alvéolos e o fluxo de ar. O comprimento das vias aéreas, a viscosidade do gás e o calibre dos diversos segmentos da árvore traqueobrônquica são fatores que podem influenciar a R_{aw} (16, 17). Um exemplo disso é que a contração do músculo liso reduz o diâmetro das vias aéreas, o que dificulta o fluxo do ar e por isso a R_{aw} aumenta (14). A R_{ti} é caracterizada pelas perdas energéticas geradas pela viscosidade referente à movimentação das moléculas que constituem o pulmão (16, 17).

A RL varia com o fluxo aéreo e com o volume pulmonar. No sistema respiratório, a velocidade do fluxo de ar diminui das vias aéreas centrais em direção as periféricas e de forma proporcional ocorre uma queda de pressão de condução do ar, o que diminui a RL. Isso explica porque as vias aéreas centrais contribuem com a maior parcela da RL (7, 16) enquanto as vias aéreas periféricas são responsáveis por apenas 10 a 25% do total da RL (18).

A C_{dyn} é a capacidade do pulmão em se expandir a uma determinada pressão (19). A C_{dyn} avalia as características pressão-volume durante a respiração, ou seja, quando há um fluxo de ar (1). Em condições fisiológicas, um pulmão com C_{dyn} aumentada se expande com mais facilidade em resposta a uma pressão do que um pulmão menos complacente (20). Porém, algumas doenças podem levar ao aumento da C_{dyn}, como por exemplo enfisema, que aumenta a C_{dyn} haja visto que destrói o tecido septal alveolar que normalmente se opõe a expansão pulmonar (1). A C_{dyn} é influenciada principalmente pela elasticidade do tecido pulmonar e pela tensão superficial, porém também pode ser regulada pela contração do músculo liso (15), pois já foi demonstrado um aumento da C_{dyn} em associação com o relaxamento da célula muscular lisa, e uma redução desse parâmetro da mecânica respiratória em paralelo com a contração desse músculo (21).

O músculo liso das vias aéreas pode ser contraído diretamente por substâncias que ativam receptores na superfície das células musculares lisas, como a acetilcolina (ACh) e outros agonistas colinérgicos, a histamina, os leucotrienos cisteínicos, o tromboxano A₂ e as prostaglandinas F_{2α} e D₂. O músculo liso pode, ainda, contrair de forma indireta por agentes químicos ou físicos que induzem outras células a liberarem essas substâncias constritoras, como é o caso do alérgeno (agente químico) e da perda de calor e/ou água pelas vias aéreas durante um exercício (agente físico), que estimulam a liberação de histamina pelos mastócitos (22, 23).

A ACh é o principal neurotransmissor excitatório parassimpático do sistema respiratório, onde tem o importante papel de regular o tônus broncomotor e a secreção de muco. Além disso, a ACh também participa da regulação da resposta inflamatória e do remodelamento das vias aéreas em doenças inflamatórias pulmonares (24).

A ACh é sintetizada pela enzima colina-acetiltransferase (CAT) que catalisa uma única reação entre os substratos colina e acetil-coenzima A. A produção de ACh ocorre tanto nas células neuronais quanto em outros tipos celulares não neuronais, o que sugere que além de neurotransmissor, a ACh também pode atuar como um hormônio com ação autócrina e parácrina (25, 26). Nas vias aéreas, a ACh é liberada pelas células neuronais, porém é sugerido que células que expressam a enzima CAT também são capazes de secretarem a ACh, como as células epiteliais, músculo liso, fibroblastos, mastócitos e macrófagos (25, 27). A ACh é inativada pela hidrólise em ácido acético e colina catalisada pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) ou butirilcolinesterase. Além das células neuronais, a AChE também é expressa em células não-neuronais, incluindo as células epiteliais das vias aéreas (25).

As ações da ACh são efetuadas através da ativação de receptores expressos na membrana plasmática que são divididos em duas classes principais: i) nicotínicos, que são canais iônicos de ação direta; ii) muscarínicos, que são receptores acoplados a uma proteína G. Ambos os tipos de receptores estão presentes no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico (SNP) e em tecidos não-inervados (28).

Os receptores nicotínicos são constituídos por 5 subunidades protéicas transmembranares que podem ser todas iguais o que forma os receptores homopentâmeros, ou que podem ser subunidades diferentes o que compõe os receptores heteropentâmeros. As subunidades são denominadas alfa (α), beta (β), delta (δ), gama (γ) e *epsilon* (ϵ) (29) e, existem 10 tipos de subunidades α , 4 tipos de subunidades β e um tipo de subunidade δ , γ e ϵ

(30). Nas vias aéreas, os receptores nicotínicos são expressos nos nervos parassimpáticos e em células não-neuronais, incluindo, macrófagos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos, células epiteliais e músculo liso. Ainda não são bem descritos os efeitos da ativação dos receptores nicotínicos na célula muscular lisa, embora esse tipo celular também expresse o receptor nicotínico de subtipo α_7 que parece ter ação anti-inflamatória em outras células do sistema respiratório (25).

Os receptores muscarínicos são diferenciados em cinco subclasses: M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 . As subclasses M_1 , M_3 e M_5 estão acopladas à proteína-G quiescente (Gq) e dessa forma ativam a enzima fosfolipase C (PLC). Já as subclasses M_2 e M_4 estão acopladas a proteína G inibitória (Gi) e assim levam a inibição da enzima adenilato ciclase (AC) (31). Os subtipos de receptores muscarínicos que são predominantemente expressos nas vias aéreas são M_1 , M_2 e M_3 . Os principais efeitos dos receptores muscarínicos nas vias aéreas são a estimulação da secreção de muco pelas células mucosas através da ativação do subtipo M_3 e a contração do músculo liso mediada por esse mesmo subtipo. Além disso, já foram descritos efeitos pró-inflamatórios desses receptores nas células estruturais e inflamatórias das vias aéreas, o que sugere que a ACh através desses receptores possa modular a inflamação e o remodelamento das vias aéreas em algumas doenças inflamatórias pulmonares como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (24, 25).

A contração do músculo liso das vias aéreas pela ACh e outros agonistas colinérgicos é promovida através da ativação do receptor M_3 que estimula a enzima PLC a hidrolisar um componente da membrana plasmática denominado fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. Essa hidrólise resulta na formação de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e de diacilglicerol (DAG). O IP3 aumenta os níveis citoplasmáticos de Ca^{+2} através da mobilização de Ca^{+2} do retículo endoplasmático (RE), enquanto o DAG ativa a proteína cinase C (PKC) (26, 32).

A contração é iniciada quando o Ca^{+2} se liga à proteína calmodulina e forma o complexo cálcio-calmodulina que ativa a enzima cinase de cadeia leve de miosina (MLCK). A MLCK fosforila a cadeia leve reguladora da miosina (MLC) e, a partir daí, inicia-se a interação da miosina com a actina, o que culmina na contração do músculo liso (14). A contração é mantida pela entrada de Ca^{+2} extracelular através dos canais de Ca^{+2} operados por armazenamento (SOCs), localizados na membrana plasmática, que são abertos em resposta a redução de Ca^{+2} no RE (33). Quando o estímulo para a contração cessa, a enzima fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) desfosforila a MLC, o que desfaz a interação da miosina com a actina e por isso a contração é encerrada (34).

A PKC participa tanto do início quanto da manutenção da contração do músculo liso das vias aéreas, pois essa enzima estimula a saída de Ca^{+2} do RE, promove a entrada de Ca^{+2} extracelular na célula muscular lisa (26) e reduz a atividade da enzima MLCP (22).

O músculo liso das vias aéreas pode ser relaxado por duas formas: direta, que é quando uma substância atua sobre receptores presentes na própria célula muscular lisa, como por exemplo, agem os agonistas β -adrenérgicos. Ou de forma indireta, que é quando uma substância estimula o epitélio a liberar alguns fatores tais como óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaciclina (PGI_2) (35, 36) que promovem o relaxamento do músculo liso.

Os agonistas β -adrenérgicos, a PGE_2 e a PGI_2 promovem o relaxamento do músculo liso das vias aéreas através da elevação dos níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (37). Já o NO e o CO exercem seu efeito relaxante pela indução do aumento dos níveis intracelulares de monofosfato de guanossina cíclico (GMPc) (38). Os receptores β adrenérgicos são divididos em três subtipos (β_1 , β_2 e β_3) e todos eles são receptores acoplados a proteína-G estimulatória (Gs), sendo assim, a estimulação desses receptores resulta num aumento nos níveis intracelulares de AMPC. O músculo liso das vias aéreas expressa o subtipo β_1 e de forma predominante o subtipo β_2 (39). Embora o subtipo β_1 esteja presente, apenas ao subtipo β_2 são atribuídas às ações de regulação do tônus muscular e de relaxamento do músculo liso das vias aéreas (40, 41). Devido a esses efeitos, os agonistas β_2 são considerados, em associação com os glicocorticóides, o principal tratamento para a asma (37).

As prostaglandinas são ácidos graxos insaturados sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA). O AA é produzido através da hidrólise dos fosfolipídios das membranas celulares pela enzima fosfolipase A2 (42). Ao ser liberado, o AA é convertido em prostaglandina G_2 (PGG_2) pela atividade oxigenase da enzima ciclooxigenase (COX), e em seguida, a atividade peroxidase dessa mesma enzima converte PGG_2 na prostaglandina H_2 (PGH_2) (43). Três isoformas de COX foram identificadas. A COX-1 é expressa constitutivamente em diferentes tecidos e é a principal produtora de prostanóides durante a homeostasia. A COX-1 modula diversos eventos celulares que vão desde a proliferação até a angiogênese. A COX-2 é a isoforma induzível cuja expressão é estimulada por diversos mediadores inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento. É a principal produtora de prostanóides em doenças inflamatórias e proliferativas. A COX-2 apresenta 60% de homologia com a COX-1 e apesar das diferenças, ambas isoformas produzem PGH_2 e contribuem para a síntese de prostaglandinas durante a homeostasia e inflamação (44, 45). A

COX-3 foi a última isoforma a ser identificada. Ela foi caracterizada como sendo o resultado de um *splicing* alternativo da COX-1. A COX-3 é altamente expressa no córtex cerebral, e também está presente no coração e no músculo esquelético. Atualmente ainda não é conhecido o papel fisiológico da COX-3, mas é sugerido que ela possa desempenhar alguma ação na sensibilidade a dor (44, 46, 47). Em comparação às COX-1 e COX-2, é descrito que a COX-3 tem uma atividade enzimática reduzida, é menos potente, produz menos prostaglandinas e é mais sensível ao acetaminofeno (48).

A partir da PGH_2 diversas prostaglandinas são produzidas pela ação de diferentes enzimas sintases, como por exemplo a enzima PGE_2 sintase dá origem a PGE_2 , enquanto a enzima PGI_2 sintase produz a PGI_2 . As ações da PGE_2 são mediadas pela ativação de quatro subtipos de receptores para PGE_2 denominados EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 . O subtipo EP_1 está acoplado à proteína Gq, portanto sua ativação culmina no aumento dos níveis intracelulares de Ca^{+2} . Os subtipos EP_2 e EP_4 estão acoplados a proteína Gs e como consequência promovem a elevação dos níveis intracelulares de AMPc. O subtipo EP_3 pode estar acoplado a proteína Gi, o que leva a inibição da produção de AMPc, ou pode estar ligado a proteína G_{12} (46), cuja estimulação induz a ativação da proteína RhoA (49). O músculo liso das vias aéreas dos seres humanos expressa os subtipos EP_2 , EP_3 e EP_4 , sendo que a PGE_2 relaxa o músculo liso através da ativação dos subtipos EP_2 e EP_4 e contrai esse músculo pela estimulação do subtipo EP_3 (42, 50). O subtipo EP_1 ainda não foi detectado na célula muscular lisa das vias aéreas de seres humanos, mas está presente nesse mesmo tipo celular em outras espécies, onde ele promove a contração (37). Além da PGE_2 , a PGI_2 também promove o relaxamento do músculo liso das vias aéreas (51). Esse efeito ocorre através da ligação ao seu receptor específico IP que também está acoplado a uma proteína Gs (37, 46).

O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. Três isoformas da enzima NOS são conhecidas (NOS-1, NOS-2 e NOS-3). As isoformas NOS-1 e NOS-3 são expressas constitutivamente em vários tipos celulares, necessitam de Ca^{+2} para serem ativadas e produzem NO em concentrações picomolares. A isoforma NOS-2 é expressa em resposta a fatores inflamatórios, é independente de Ca^{+2} e libera NO em quantidades nanomolares (43, 52). Nas vias aéreas, a NOS-1 é encontrada nos neurônios não-adrenérgicos e não-colinérgicos, a NOS-2 é expressa principalmente nos macrófagos e nas células epiteliais, e a NOS-3 no epitélio e endotélio (53). O relaxamento do músculo liso das vias aéreas pelo NO ocorre através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que produz GMPc a partir de trifosfato de guanosina (GTP)(54).

O AMPc e o GMPc relaxam o músculo liso das vias aéreas ao promoverem a redução dos níveis intracelulares de Ca^{+2} e a dessensibilização das proteínas contráteis ao Ca^{+2} (32, 55). O AMPc ao ser produzido ativa a proteína cinase A (PKA) e o GMPc ao ser formado estimula a proteína cinase G (PKG). Tanto a PKA quanto a PKG promovem a recaptação de Ca^{+2} pelo RE além defosforilarem a MLCK, os canais para potássio de alta condutância ativados por Ca^{+2} (BK_{Ca}) e os receptores acoplados à proteína Gq (37, 54, 56, 57). A fosforilação da MLCK resulta na redução da afinidade da MLCK pela calmodulina. Os receptores acoplados à proteína Gq ao serem fosforilados ficam inibidos. Os BK_{Ca} fosforilados se tornam ativos e hiperpolarizam a célula muscular lisa o que culmina no fechamento dos canais de Ca^{+2} da membrana plasmática e do RE (22, 37).

Além da PKA, estudos recentes tem implicado as proteínas de troca diretamente ativadas pelo AMPc (Epac) como também efetores do efeito relaxante do AMPc no músculo liso das vias aéreas (58). A Epac pode ser ativada pela PKA ou diretamente pelo AMPc. É sugerido que a Epac exerce sua ação relaxante ao inibir a proteína pró-contrátil RhoA e como consequência inibe a fosforilação da MLC(37, 56).

O músculo liso é o principal efector da reatividade das vias aéreas que é um fenômeno fisiológico de obstrução moderada das vias aéreas em resposta a estímulos não específicos. O papel fisiológico dessa reatividade permanece incerto, porém alterações na fisiologia do músculo liso e na reatividade das vias aéreas desempenham importante função em várias doenças pulmonares (32).

1.2 Doenças pulmonares

Doenças pulmonares referem-se a qualquer distúrbio que ocorre nos pulmões ou que leve ao funcionamento inadequado desses órgãos. Essas doenças constituem importante causa de adoecimento e morte em adultos e crianças no mundo (59). Dentre essas pessoas que sofrem de alguma doença pulmonar mais de 500 milhões vivem em países em desenvolvimento (60).

A principal classificação das doenças pulmonares é baseada na alteração da mecânica respiratória e dessa forma são divididas em 2 grupos: obstrutivas e restritivas. As doenças pulmonares obstrutivas são caracterizadas por um aumento na resistência ao fluxo de ar em decorrência de uma obstrução parcial ou total em qualquer nível da árvore traqueobrônquica. Essa dificuldade na passagem de ar pode ser causada por uma diminuição no diâmetro das vias aéreas, como ocorre na asma, por uma perda da integridade das vias aéreas, como é

encontrada na broncomalácia, ou por uma redução no recuo elástico dos pulmões, como é o caso do enfisema. As principais doenças pulmonares obstrutivas são asma, DPOC e bronquiectasia (61, 62).

As doenças pulmonares restritivas são definidas por apresentarem uma expansão reduzida do parênquima pulmonar, ou seja, uma baixa complacência, o que limita a chegada do ar aos pulmões e a manutenção do volume normal de ar nos mesmos. As doenças pulmonares restritivas podem ocorrer devido a vários defeitos, entre eles um aumento no recuo elástico do parênquima pulmonar, uma fraqueza nos músculos respiratórios ou até restrições mecânicas. Pneumoconioses, fibrose pulmonar idiopática e lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) são exemplos de distúrbios pulmonares restritivos (61-63).

As doenças pulmonares que apresentam um intenso processo inflamatório pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas são caracterizadas como sendo doenças inflamatórias pulmonares (64, 65). Essas doenças são um importante problema de saúde pública devido a sua alta prevalência, morbidade e mortalidade além de elevados custos sociais e econômicos. Dentro desse grupo estão a LPA/SDRA e a asma (66-68).

1.2.1. LPA/SDRA

A LPA é uma síndrome clínica caracterizada por um comprometimento na troca gasosa e/ou na mecânica pulmonar, o que causa hipoxemia e insuficiência respiratória aguda. A LPA pode evoluir para uma forma mais severa que é denominada SDRA (69). Até poucos anos atrás, a definição clínica mais aceita e utilizada para a LPA e SDRA era a da Conferência de Consenso Americana-Européia de 1994. Segundo essa Conferência, os pacientes eram diagnosticados com LPA se apresentassem um infiltrado pulmonar bilateral à radiografia de tórax, pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg ou ausência de sinais clínicos ou ecocardiográficos de hipertensão atrial esquerda, além de relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ qualquer que fosse o nível da pressão positiva expiratória final (PEEP) utilizada. Já a SDRA era definida pelos mesmos parâmetros clínicos, com exceção da relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ que nesse caso era ≤ 200 , o que caracterizava uma hipoxemia mais grave (70). Em 2011, a Sociedade Européia de Medicina Intensiva com o apoio da Sociedade Torácica Americana e da Sociedade de Medicina de Cuidados Críticos convocaram especialistas do mundo todo para revisarem a definição da SDRA. Essa nova caracterização foi denominada definição de Berlim que estabeleceu a remoção do termo LPA e dividiu a SDRA em três categorias

mutuamente exclusivas, com base no grau de hipoxemia: SDRA leve ($200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$), SDRA moderada ($100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) e SDRA grave ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$). Além disso, segundo a definição de Berlim, para um paciente ser diagnosticado com SDRA, o início agudo da insuficiência respiratória deve ocorrer em no máximo uma semana após o insulto agudo ou piora dos sintomas respiratórios. As opacidades pulmonares bilaterais consistentes com edema na radiografia de tórax foram mantidas para o diagnóstico da SDRA, mas tais alterações podem ser baseadas em imagens obtidas através de tomografia de tórax. O edema pulmonar da SDRA não pode ser atribuído a doença cardíaca nem a sobrecarga de volume mas não é mais necessária a medida da oclusão da artéria pulmonar. Na ausência de fatores de risco conhecidos, a origem cardiogênica do edema deve ser excluída pela avaliação objetiva da função cardíaca com ecocardiografia (71).

A incidência da LPA/SDRA tem sido difícil de determinar devido à falta de uniformidade na definição da doença e a existência de variações etiológicas e geográficas (66, 72). Alguns estudos estimam que a incidência da LPA/SDRA seja de 86,2 novos casos por 100.000 pessoas por ano em adultos com idade igual ou superior a 15 anos. Nos Estados Unidos é sugerido que ocorram aproximadamente 190.000 novos casos por ano (73, 74). No Brasil não foram realizados estudos populacionais com LPA/SDRA, mas um trabalho realizado no Hospital das Clínicas de Porto Alegre mostrou uma frequência de 6,1% de LPA/SDRA em pacientes na unidade de terapia intensiva (75, 76). Embora a mortalidade associada à LPA/SDRA tenha diminuído na última década, ela ainda é considerada alta e varia de 30 a 40%. A principal causa da morte nesses pacientes com LPA/SDRA é a falência múltipla dos órgãos (66, 69). Pacientes que sobrevivem a LPA/SDRA tendem a se recuperar bem quanto aos parâmetros da função pulmonar, entretanto é comum que ocorram limitações físicas residuais, como fraqueza neuromuscular e problemas neuropsiquiátricos, como depressão e transtorno de estresse pós-traumático. Esses acometimentos além de ocasionarem uma má qualidade de vida ao sobrevivente também geram um custo econômico significativo para o próprio paciente e para a sociedade (66).

A principal característica patológica da LPA/SDRA é a lesão na membrana alvéolo-capilar dos pulmões que é composta pelo epitélio alveolar e endotélio capilar (77). Essa lesão pode ser causada por um dano direto ao pulmão, como por exemplo, uma pneumonia ou uma aspiração do conteúdo gástrico, ou por um dano indireto ao pulmão resultante de uma resposta inflamatória sistêmica como na sepse ou na pancreatite. A sepse é a causa mais frequente da

LPA/SDRA e está associada às taxas mais elevadas de mortalidade e morbidade da LPA/SDRA (72, 78).

A fisiopatologia da LPA/SDRA é descrita classicamente em duas fases: exsudativa e fibroproliferativa. A fase exsudativa é caracterizada por uma inflamação aguda na membrana alvéolo-capilar, o que acarreta em um aumento na permeabilidade dessa membrana e, como consequência, ocorre um extravasamento de fluido rico em proteínas para os espaços alveolares (66). Este ambiente inflamatório é constituído principalmente por neutrófilos ativados e macrófagos alveolares que secretam mediadores inflamatórios que prejudicam o transporte do fluido epitelial e a produção de surfactante por células alveolares do tipo II. A diminuição na produção de surfactante ocasiona uma redução na complacência pulmonar e causa o colapso alveolar (77, 79). Além disso, ocorre necrose de células alveolares do tipo I, o que contribui para o edema pulmonar e a ruptura da barreira alvéolo-capilar. A disfunção endotelial resulta na trombose capilar e na deposição de fibrina extravascular, o que potencializa a resposta inflamatória aguda (Figura 1.2). Após a fase exsudativa, a maioria dos pacientes recupera de forma gradual a fisiologia e a função pulmonar. O epitélio alveolar é reconstruído principalmente pela ação das células alveolares do tipo II que atuam como progenitoras tanto para as células alveolares do tipo I quanto para as do tipo II (79). A fase fibroproliferativa se desenvolve caso o dano epitelial seja grave ou o reparo ao epitélio seja prejudicado. Nessa fase, observa-se principalmente proliferação das células mesenquimais, neovascularização e acúmulo de fibroblastos, miofibroblastos e monócitos no interstício pulmonar (79). Fibroblastos e miofibroblastos ativados secretam grande quantidade de colágeno o que resulta num aumento da deposição de matriz extracelular (MEC) e como consequência no desenvolvimento da fibrose. Pacientes com LPA/SDRA que desenvolvem fibrose pulmonar apresentam um aumento na mortalidade. Ainda não se sabe por que alguns pacientes com LPA/SDRA progridem da fase exsudativa para a resolução enquanto outros pacientes progridem para a fibrose (Figura 1.3) (77).

Os neutrófilos desempenham papel central na fisiopatologia da LPA/SDRA e um alto número de neutrófilos no lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes com LPA/SDRA está associado com uma maior gravidade da doença. Os neutrófilos são encontrados em maior número nos capilares pulmonares em comparação a circulação sistêmica mesmo na ausência de uma resposta inflamatória, o que facilita a migração dessas células para os pulmões quando ocorre um estímulo inflamatório. Para migrarem para os pulmões, os neutrófilos precisam ser previamente ativados e os fatores que promovem essa ativação podem ser do próprio

hospedeiro, como o fator de ativação plaquetária, o leucotrieno B4 e a interleucina (IL)-8 ou, podem ser fatores provenientes dos patógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS). As principais quimiocinas envolvidas no recrutamento dos neutrófilos para os pulmões incluem a IL-8 (CXCL8) em humanos e a proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2 ou CXCL2) e KC (CXCL1) em murinos. Essas quimiocinas podem ser secretadas pelos próprios neutrófilos bem como por células epiteliais e macrófagos (80). A migração e ativação excessiva dos neutrófilos para o pulmão é uma das principais características da LPA/SDRA, pois os diversos mediadores inflamatórios liberados pelos neutrófilos que incluem proteases, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias que participam no estabelecimento e na exacerbação do dano pulmonar que ocorre na LPA/SDRA (66).

Embora os neutrófilos desempenhem papel crucial na fisiopatologia da LPA/SDRA vem crescendo o número de evidências que indicam que os macrófagos também contribuem de forma importante para o início, propagação e resolução da inflamação na LPA/SDRA (81). A ativação de macrófagos alveolares resulta na liberação de diversas moléculas pró-inflamatórias como as citocinas IL-1 β , fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), IL-6, IL-8 e ROS. Esses mediadores pró-inflamatórios podem estimular a ativação e recrutamento de neutrófilos e linfócitos para os pulmões e podem causar dano ao tecido pulmonar (82, 83). Com base na expressão gênica e na secreção de proteínas, os macrófagos são classificados em duas categorias: M1, que são os macrófagos ativados classicamente, e M2 que são os alternativamente ativados. O fenótipo M1 pode ser induzido por citocinas pró-inflamatórias do perfil de células T auxiliar (Th) 1 e pelo LPS e, é caracterizado por secretar grandes concentrações de fatores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 β , TNF- α e IL-12 além de expressar altos níveis de NOS-2. O fenótipo M2 é induzido por citocinas do perfil Th2, como a IL-4 e a IL-13 e, apresenta como principal característica a produção de moléculas anti-inflamatórias como a IL-10 além da expressão de arginase-1, Fizz-1 e Ym1 (84). Enquanto o fenótipo M1 está relacionado a respostas pró-inflamatórias e a danos teciduais, o fenótipo M2 está associado à resolução da inflamação e ao reparo tecidual. Na literatura, alguns estudos observaram que na fase exsudativa da LPA/SDRA os macrófagos alveolares são ativados para o fenótipo M1 (81). Outros estudos identificaram um papel importante para o fenótipo M2 na regulação da gravidade da LPA/SDRA, o que sugere que o fenótipo M2 possa estar envolvido na fase resolutiva da LPA/SDRA (85, 86).

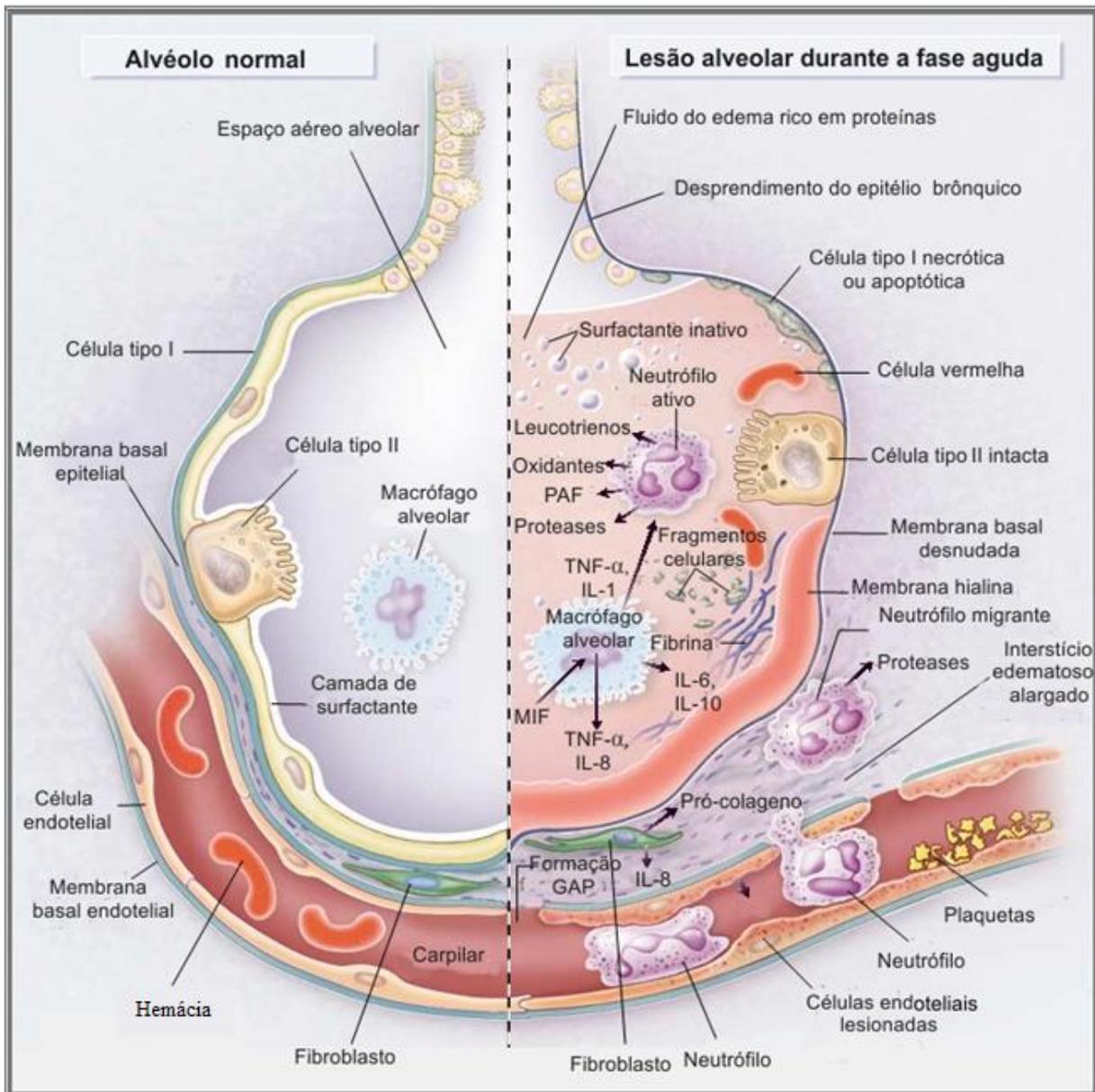


Figura 1.2 Fatores envolvidos na fisiopatologia da LPA/SDRA. Alvéolo normal (lado esquerdo) e alvéolo danificado na fase aguda da LPA/SDRA (lado direito). Na fase aguda da LPA/SDRA há o desprendimento das células epiteliais brônquicas e alveolares, com a formação de membranas hialinas, ricas em proteínas, na membrana basal desnuda. Neutrófilos aderidos ao endotélio capilar lesionado migram destes capilares através do interstício para o espaço aéreo alveolar, que está preenchido com fluido de edema rico em proteínas. No espaço alveolar, macrófagos alveolares secretam citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) e TNF- α , os quais atuam localmente estimulando a quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Os neutrófilos podem ainda liberar ROS, proteases, leucotrienos, e outras moléculas pró-inflamatórias, tais como fator de ativação plaquetária (PAF). Modificado a partir de Johnson e cols. (2010) (72).

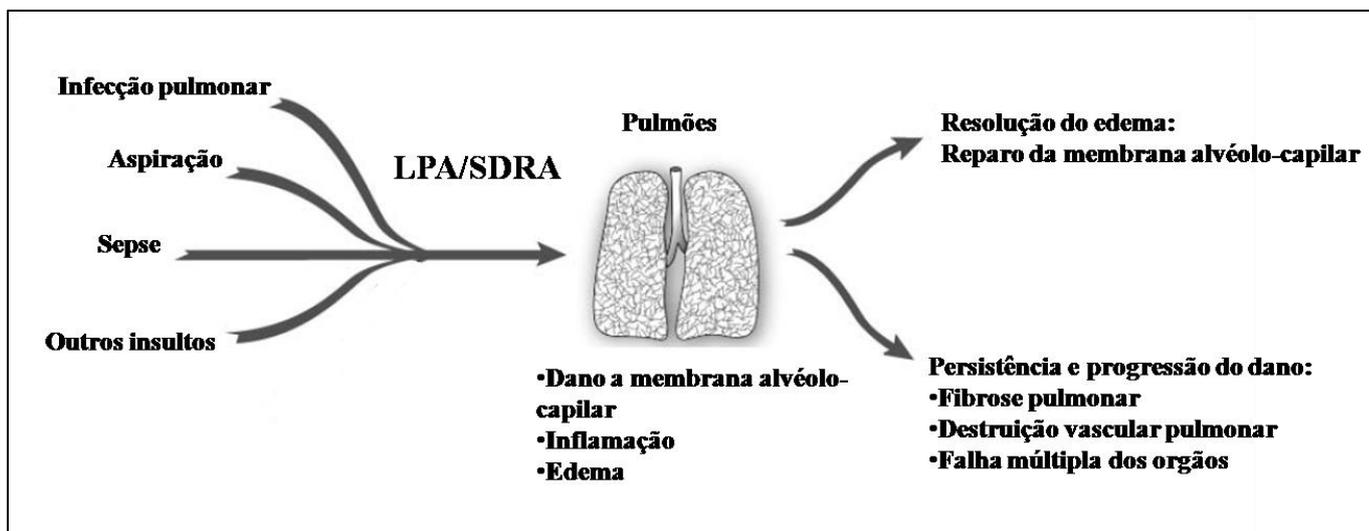


Figura 1.3. A história natural da LPA/SDRA inclui resolução e reparo versus persistência e progressão. Em alguns pacientes ocorre a resolução da LPA/SDRA com retorno a função normal dos alvéolos e pulmões. Em outros pacientes o dano epitelial é grave ou não é reparado o que resulta em fibrose pulmonar, destruição vascular pulmonar e falência múltipla dos órgãos. Ainda são desconhecidos os fatores que contribuem para cada um desses resultados. Modificado a partir de Johnson e cols. (2010) (72).

Pacientes com LPA/SDRA não possuem terapias específicas, apesar de existir um grande esforço para o desenvolvimento de tais terapias. Alguns procedimentos como suporte ventilatório de baixo volume corrente, manutenção do paciente em posição prona e tratamento da causa subjacente à LPA/SDRA são adotados como estratégia terapêutica para a LPA/SDRA (87). Dessa forma, é importante o estudo e desenvolvimento de novos tratamentos eficazes para a LPA/SDRA.

1.2.2 Asma

A asma é uma doença pulmonar crônica caracterizada por inflamação persistente, além de hiper-reatividade, obstrução e remodelamento das vias aéreas inferiores (88). As causas exatas da asma ainda não são totalmente compreendidas, mas sabe-se que o desenvolvimento da asma ocorre através de uma combinação entre fatores genéticos e exposição a fatores ambientais que incluem alérgenos, infecções virais, poluição, fumaça de cigarro, irritantes químicos no local de trabalho, exercício físico e uso de medicamentos anti-inflamatórios (89, 90). Essa variedade de fatores faz com que a asma seja considerada uma doença heterogênea que engloba pacientes com diferentes fenótipos. Entretanto, a asma possui alguns sintomas considerados clássicos que incluem episódios de tosse, sibilo, falta de ar e aperto no peito (91).

Atualmente, a asma é considerada a 14ª doença mais importante no mundo. Ela afeta cerca de 334 milhões de pessoas de todas as idades mundialmente. A prevalência dessa doença é crescente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e, é estimado que 400 milhões de indivíduos no mundo inteiro sofrerão de asma em 2025 (92). Apesar de nas últimas décadas terem ocorrido avanços na terapia da asma e desenvolvimento de guias para essa doença, pessoas ainda morrem de asma nos dias atuais. Anualmente cerca de 250 mil indivíduos morrem em virtude dessa doença no mundo (93). O Brasil possui a 8ª maior prevalência de asma no mundo (94), com aproximadamente 15 milhões de pacientes asmáticos. Anualmente, ocorrem em média 350.000 internações por asma no nosso país, o que constitui a 4ª causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (95). A cada ano, cerca de duas mil e quinhentas pessoas morrem no Brasil devido a essa enfermidade. Os custos econômicos associados à asma variam de país para país, mas em geral são altos e classificados em: i) custos diretos, que incluem gastos com medicamentos e hospitalizações; ii) custo indiretos, que resultam da mortalidade precoce ou da perda de produtividade relacionada aos dias ausentes no trabalho ou na escola; iii) custos intangíveis, que são mais difíceis de serem mensurados pois estão relacionados com redução na qualidade de vida (96). Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares, as internações por asma no Brasil em 2014 ocasionaram um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde (97).

A resposta inflamatória exerce um importante papel na fisiopatologia da asma. Na maioria dos casos, a inflamação das vias aéreas é caracterizada por uma reação do tipo alérgica em que há a predominância de mastócitos, eosinófilos e linfócitos Th2 (65). Essa resposta inflamatória inicia-se quando indivíduos geneticamente suscetíveis inalam pela primeira vez um alérgeno que penetra nas vias aéreas, o que induz a secreção de IL-25, IL-33 e linfopoetina do estroma tímico (TSLP) pelas células epiteliais. Essas citocinas ativam células apresentadoras de antígeno, incluindo as células dendríticas que fagocitam e processam o alérgeno e, migram até os linfonodos onde induzem a diferenciação das células T *naïve* para perfil Th2 (98). Os linfócitos Th2 ativados liberam diversas citocinas incluindo IL-4 e IL-13 que induzem a proliferação dos linfócitos B e a produção de imunoglobulina (Ig) E por esses linfócitos (99). A IgE é secretada pelas células B na circulação e liga-se a receptores de alta afinidade para IgE (FceRI) expressos na membrana plasmática de mastócitos presentes nos tecidos e de basófilos presentes no sangue. Essa fase inicial foi denominada de fase de sensibilização da asma. Quando ocorre uma re-exposição ao alérgeno, inicia-se a fase efetora da asma em que o alérgeno liga-se a IgE acoplada aos FceRI, o que induz a secreção de

mediadores inflamatórios como histamina, prostaglandinas, leucotrienos cisteínicos, proteases e citocinas (100) (Figura 1.4). Esses mediadores promovem secreção de muco, broncoconstrição, formação de edema, recrutamento e ativação de linfócitos Th2, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e macrófagos, além de estimularem a ativação de células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas (101, 102).

Nessa fase efetora, os eosinófilos são recrutados para os pulmões através de estímulos como eotaxinas e passam a ser células efetoras centrais na asma (91). A inflamação eosinofílica está presente em uma parcela significativa de pacientes com asma grave e, está associada a exacerbações e diminuição da função pulmonar (103). Os eosinófilos são capazes de produzir e liberar uma grande variedade de produtos pró-inflamatórios, incluindo proteínas catiônicas (proteína básica principal, proteína eosinofílica catiônica, peroxidase eosinofílica (EPO), entre outras), citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos e ROS (Figura 1.4). Ao liberarem esses mediadores, os eosinófilos modulam a função de diversas células inflamatórias e estruturais e provocam dano ao tecido pulmonar, o que contribui para desencadeamento da hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas (91, 103, 104).

Os linfócitos Th2 também são considerados células efetoras na fisiopatologia da asma. Esses linfócitos participam e coordenam o início e a progressão da resposta inflamatória através da liberação de citocinas, especialmente de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, cujos níveis encontram-se aumentados em pacientes asmáticos (99). A IL-4 é essencial para diferenciação e expansão dos linfócitos Th2, estimula a síntese de IgE pelos linfócitos B e induz a liberação de algumas quimiocinas pelas células epiteliais das vias aéreas. A IL-13 também induz a produção de IgE pelos linfócitos B e, além disso, provoca aumento da secreção de muco, hiper-reatividade das vias aéreas, fibrose subepitelial além de estimular a secreção de eotaxinas pelo epitélio e pelo músculo liso das vias aéreas. A IL-5 desempenha um importante papel na migração, maturação e sobrevivência dos eosinófilos (105), enquanto a IL-9 promove o crescimento de mastócitos e a produção de outras citocinas pelos linfócitos Th2 (100).

Recentemente, um fenótipo de células Th denominado Th17 foi identificado como sendo também um componente da resposta inflamatória na asma. Os linfócitos Th17 secretam principalmente a IL-17, que estimula a ativação e o recrutamento de neutrófilos para os pulmões e induz a produção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais e musculares lisas das vias aéreas. Em pulmões de pacientes com asma grave há um aumento nos níveis de

IL-17 e no número de neutrófilos, o que sugere que os linfócitos Th17 e os neutrófilos desempenhem papel importante no agravamento da asma (99).

Embora as células inflamatórias sejam importantes na resposta inflamatória da asma, atualmente é admitido que as células estruturais como células epiteliais, musculares lisas e fibroblastos também estão envolvidas no desenvolvimento e perpetuação da inflamação asmática (106). O epitélio das vias aéreas que anteriormente era considerado apenas uma barreira protetora contra insultos externos, atualmente é reconhecido como um participante importante na fisiopatologia da asma uma vez que secreta ativamente mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, citocinas e fatores de crescimento (107). Uma das principais citocinas produzidas pelas células epiteliais das vias aéreas é a TSLP que induz ativação das células dendríticas de forma que essas promovam uma polarização para perfil Th2 dos linfócitos T *naïve*. Outras citocinas liberadas pelo epitélio das vias aéreas incluem TNF- α e IL-1 β que podem ativar mastócitos; IL-8 que recruta neutrófilos; eotaxinas que são quimioatraentes de eosinófilos. Dentre os fatores de crescimento secretados pelas células epiteliais das vias aéreas que contribuem para a resposta inflamatória na asma podem ser destacados o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que aumenta a sobrevivência de eosinófilos e neutrófilos, e o fator de células-tronco (SCF), que prolonga a sobrevivência de mastócitos (100). Durante muitos anos, a participação do músculo liso na fisiopatologia da asma estava relacionada apenas a sua função contrátil. Nos dias atuais, o músculo liso também é considerado uma fonte de mediadores pró-inflamatórios nas vias aéreas, como IL-5, IL-8, eotaxinas, GM-CSF, SCF, fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), que contribuem de forma significativa para a perpetuação do processo inflamatório crônico que ocorre nas vias aéreas durante a asma (108-110). Como exemplo, o TGF- β induz a proliferação de fibroblastos e a deposição de componentes da matriz extracelular por essas células (100). Os fibroblastos são o tipo celular mais comum nos tecidos conjuntivos e o principal produtor de MEC. Eles também são os principais mediadores do acúmulo de MEC que ocorre numa fibrose desencadeada por um dano tecidual prolongado e inflamação crônica. Além da produção de MEC, os fibroblastos têm múltiplas funções biológicas, como a participação na inflamação, a qual também está entrelaçada com o processo de fibrose. Os fibroblastos produzem TGF- β , IL-1 β , ROS, quimiocinas, entre outros fatores que auxiliam na ativação e migração de células imunes. Dessa forma, os fibroblastos contribuem para a inflamação aguda e crônica e, reciprocamente, as citocinas inflamatórias estimulam a transição dos fibroblastos para miofibroblastos, o que culmina na fibrose (111).

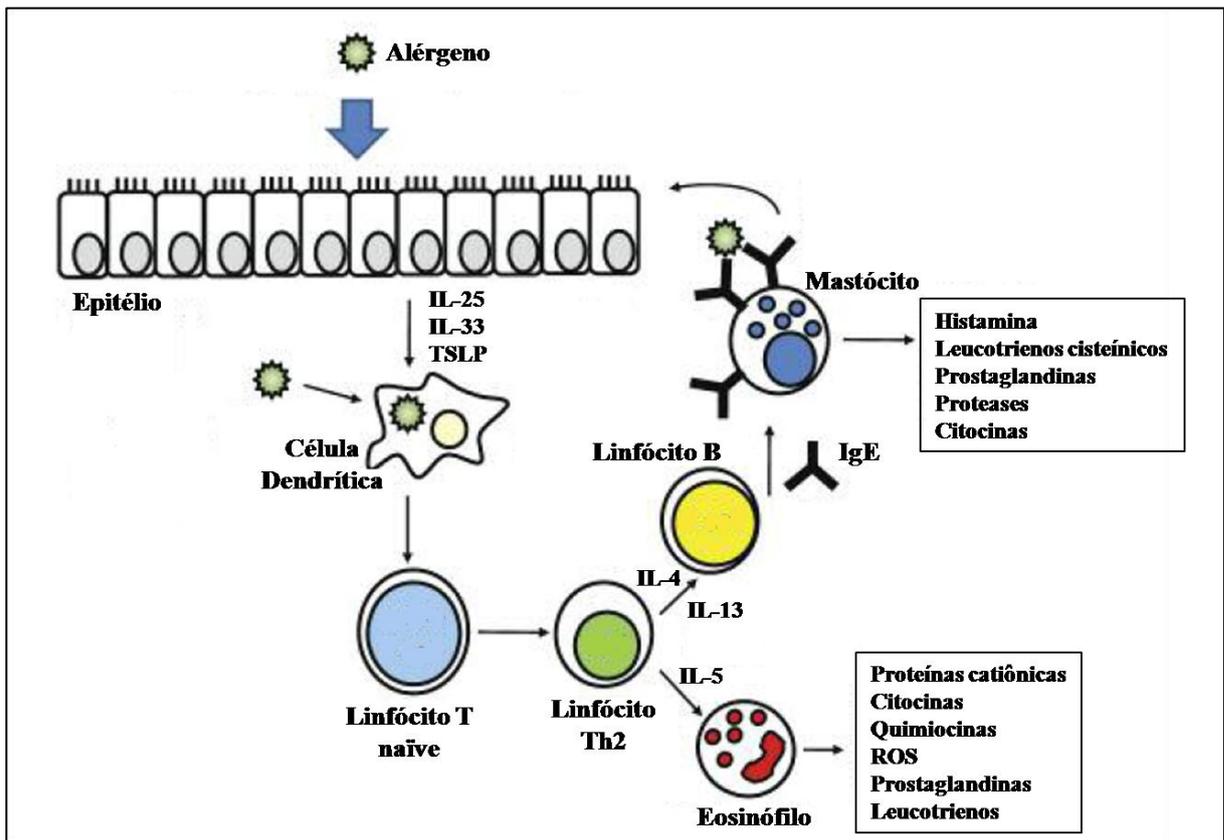


Figura 1.4. Resposta inflamatória na fisiopatologia da asma. Alérgenos penetram nas vias aéreas e ativam o epitélio a liberarem TSLP, IL-25 e IL-23. Essas citocinas ativam as células dendríticas que apresentam o alérgeno para células T *naíve* e também induzem a diferenciação desses linfócitos T *naíve* para perfil Th2. Os linfócitos Th2 estimulam a produção de IgE pelos linfócitos B através das citocinas IL-4 e IL-13. A IgE se fixa a receptores na superfície dos mastócitos e o alérgeno ao se ligar a esses receptores desencadeia a liberação de mediadores, que induzem broncoconstrição e inflamação, pelos mastócitos. A secreção de IL-5 pelas células Th2 recruta e ativa eosinófilos. Mediadores inflamatórios liberados pelos eosinófilos, células T e mastócitos resultam em danos ao tecido pulmonar. Modificado a partir de Ishmael (2011) (100).

A inflamação crônica na asma está associada ao fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas, que é um estreitamento exagerado dessas vias em resposta a estímulos químicos, físicos ou farmacológicos, que provocariam apenas uma constrição limitada em indivíduos saudáveis (112). O músculo liso é a principal célula efetora da broncoconstrição e da hiper-reatividade das vias aéreas nos pacientes asmáticos (34). A hiper-reatividade das vias aéreas é encontrada em praticamente todos os pacientes com asma, por isso, é considerada uma das principais características dessa doença e, é responsável pelos sintomas clássicos da asma (113, 114). Entretanto, a intensidade da hiper-reatividade das vias aéreas varia entre os pacientes asmáticos, onde os indivíduos com asma mais grave frequentemente apresentam um maior grau de hiper-reatividade das vias aéreas (114). Além disso, evidências na literatura sugerem que a forma crônica de hiper-reatividade das vias aéreas resulta do processo de remodelamento das mesmas (114, 115).

O remodelamento das vias aéreas são alterações estruturais observadas em pacientes asmáticos resultante de uma resposta inflamatória crônica. As alterações estruturais incluem metaplasia e perda da integridade das células epiteliais brônquicas, espessamento da membrana basal, hiperplasia das glândulas submucosas e das células *globet*, fibrose subepitelial, angiogênese, hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa (91, 116) (Figura 1.5).

Atualmente, o tratamento mais utilizado na asma é a associação de corticosteróides inalados e agonistas β_2 . Apesar dos corticosteróides representarem a terapia mais eficaz, há uma grande preocupação quanto as suas utilizações, devido aos efeitos adversos que produzem. Além disso, uma pequena parcela de pacientes com asma não respondem ao tratamento com corticosteróides, mesmo quando altas doses são administradas (117). Esses pacientes são chamados de “resistentes aos glicocorticóides” e representam um desafio para o controle da asma. Também existe um grande receio quanto à utilização dos agonistas β_2 , especialmente quando esses são administrados sem serem combinados com os corticosteróides. A monoterapia contínua e repetida desses agonistas β_2 está sendo associada a exacerbação da inflamação alérgica na asma e ao aumento do risco de morte pelos asmáticos. Por isso, é necessária a busca de novos tratamentos eficazes e seguros para a asma (118).

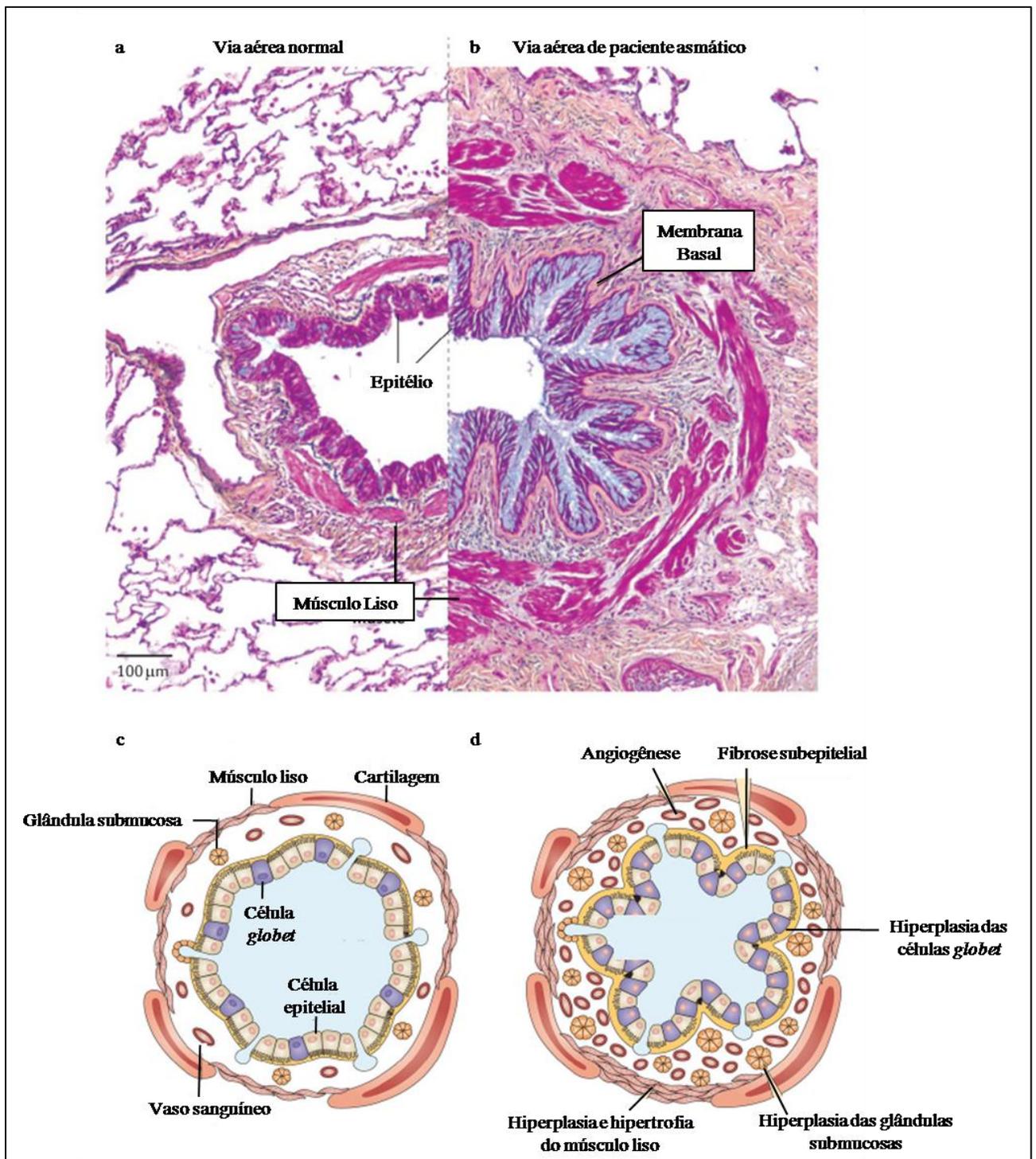


Figura 1.5. Remodelamento das vias aéreas na asma. Vias aéreas de indivíduos saudáveis (a) e de pacientes com asma (b). As letras c e d são esquemas representativos das vias aéreas retratadas em a e b, respectivamente. As vias aéreas na asma apresentam remodelamento considerável, que inclui fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, angiogênese e hiperplasia das células *globet* e das glândulas submucosas. Modificado a partir de Fahy (2015) (119).

1.3 Glucagon

O glucagon é um hormônio polipeptídico constituído por 29 aminoácidos que pertence a superfamília das secretinas, na qual, também fazem parte a secretina, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP), os peptídeos semelhantes ao glucagon (GLP) -1 e -2, dentre outros (120). Todos eles possuem um resíduo de fenilalanina na posição seis e compartilham uma significativa homologia estrutural e conformacional (121, 122).

O glucagon é produzido por clivagem pós-traducional do precursor pró-glucagon, que é um polipeptídeo de 160 aminoácidos expresso nas células α das Ilhotas de Langerhans do pâncreas, L intestinais, e no cérebro. Esse precursor é processado por enzimas pró-hormônio convertases (PCs) que são tecido-específicas. Nas células α pancreáticas predomina a expressão da enzima PC2, que cliva o pró-glucagon em glucagon e em outros produtos como o fragmento principal do pró-glucagon e polipeptídeo pancreático relacionado com a glicentina (GRPP). No intestino e no cérebro, o pró-glucagon é clivado em GLP-1, GLP-2, glicentina, oxintomodulina e GRPP pela enzima PC1/3 (123).

O glucagon é secretado pelas células α pancreáticas em resposta a hipoglicemia. A secreção de glucagon também é estimulada pelo aumento nos níveis de aminoácidos e lipídios na circulação, pelo peptídeo oxintomodulina, pela ativação adrenérgica e pelo próprio glucagon, dentre outros fatores. Em contrapartida, a liberação de glucagon é inibida por alguns fatores que incluem hiperglicemia, insulina, somatostatina, íons zinco, o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico e GLP-1(124-126).

O principal papel fisiológico do glucagon é proteger o organismo contra a hipoglicemia que pode causar danos, sobretudo ao SNC que em condições normais utiliza a glicose como única fonte de energia. A ação fisiológica central do glucagon é aumentar os níveis de glicose sanguínea através da estimulação da glicogenólise e gliconeogênese e da inibição da glicólise e da glicogênese no fígado, o que antagoniza as ações da insulina e, dessa forma, os dois hormônios participam da regulação da glicemia (127, 128). O glucagon também é capaz de produzir efeitos extra-hepáticos, incluindo estimulação da lipólise no tecido adiposo, relaxamento do músculo liso do trato gastrointestinal, aumento da taxa de filtração glomerular nos rins e da contratilidade cardíaca, indução da sensação de saciedade no SNC e potenciação da secreção de insulina induzida pela glicose nas células β pancreáticas (124, 129, 130) (Figura 1.6).

Orgão	Expressão do GcgR	Efeitos
 Cérebro	 Baixa	↑ Saciedade; ↑ Metabolismo neuronal de corpos cetônicos; ↑ Atividade nervosa simpática; ↑ Secreção de somatostatina pelo hipotálamo
 Coração	 Baixa	↑ Frequência cardíaca; ↑ Contratilidade do miocárdio; ↑ Oxidação lipídica; ↑ Condução atrio-ventricular; ↓ Sobrevivência de cardiomiócitos
 Fígado	   Alta	↑ Glicogenólise e gliconeogênese; ↓ Glicólise e glicogênese; ↑ Oxidação lipídica; ↑ Sobrevivência de hepatócitos; ↓ Síntese de lipídios
 Glândulas Adrenais	 Baixa	↓ Produção de cortisol estimulada por ACTH
 Pâncreas	 Baixa	↑ Secreção de insulina pelas células β estimulada por glicose; ↑ Excitose na célula α
 Pulmão	 Baixa	↓ Contração do músculo liso dos brônquios de cobais <i>in vitro</i>
 Rins	   Alta	↑ Taxa de filtração glomerular; ↑ Reabsorção de água; ↑ Excreção de K^+ ; ↑ Secreção de bicarbonato; ↑ Proliferação de células mesangiais; ↓ Acidificação urinária
 Tecido Adiposo	 Baixa	↑ Termogênese dos tecidos marrom e branco; ↑ Crescimento do adipócito marrom; ↑ Lipólise do tecido branco
 Trato Gastro-intestinal	 Baixa	↑ Secreção de grelina no estômago; ↑ Relaxamento do Esfincter de Oddi; ↓ Motilidade gastro-intestinal

Figura 1.6. Expressão e efeitos do GcgR em vários órgãos e tecidos do organismo. O glucagon exerce efeitos biológicos diretos através de seu receptor que é altamente expresso no fígado e no rim e é menos expresso no tecido adiposo, nas glândulas adrenais, no cérebro, no trato gastrointestinal, no coração, no pulmão e no pâncreas. ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. Modificado a partir de Bansal & Wang (2008) (130) e Campbell & Drucker (2015) (124).

O glucagon exerce suas ações através da ativação do seu receptor (GcgR), que é altamente expresso no fígado e nos rins, e em menor abundância em diversos outros órgãos e tecidos incluindo coração, trato gastrointestinal, cérebro, tecido adiposo, pâncreas, glândulas adrenais e pulmão (130, 131) (Figura 1.6). O GcgR é membro da família dos receptores acoplados a proteína Gs e, portanto, a ligação do glucagon ao seu receptor promove ativação da enzima adenilato ciclase com subsequente aumento nos níveis intracelulares de AMPc (132).

O AMPc é um segundo mensageiro que regula diversos processos celulares importantes, incluindo metabolismo, expressão gênica, apoptose, proliferação, diferenciação celular e secreção. O AMPc exerce seus efeitos principalmente através da estimulação da PKA, que fosforila diversas moléculas, incluindo a proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (CREB). Além disso, o AMPc também pode ativar Epac, sendo essa uma via independente da ativação da PKA (133, 134). Nas vias aéreas, a elevação dos níveis intracelulares de AMPc promove o relaxamento do músculo liso e inibe alguns elementos da resposta inflamatória, incluindo secreção de citocinas pelas células epiteliais, ativação e proliferação de linfócitos T e fibroblastos, ativação e recrutamento de eosinófilos, macrófagos e neutrófilos (135-137). Além disso, o aumento de AMPc induz apoptose de diversas células inflamatórias, a exemplo de mastócitos, linfócitos e fibroblastos (134, 138, 139). Neste contexto, a modulação dos níveis intracelulares de AMPc tem sido considerada um importante alvo terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares, incluindo a asma (136).

O GcgR, como a maioria dos receptores acoplados a proteína G, está sujeito a uma regulação que evita a sua superestimulação e uma resposta exagerada ao glucagon. Essa regulação ocorre através da sua dessensibilização, que faz com que o GcgR perca sua capacidade de resposta quando é estimulado de forma prolongada pelo glucagon. Após a ligação do glucagon ao GcgR, a dessensibilização é iniciada pela fosforilação dos resíduos de serina do GcgR pelas cinases dos receptores acoplados a proteína G (GRKs) ou pela PKC. Essa fosforilação provoca o recrutamento da proteína β -arrestina que se liga ao GcgR e desacopla esse receptor a sua proteína G associada (140, 141). Após o desacoplamento, a β -arrestina também direciona o GcgR para ser internalizado através de endocitose em vesículas revestidas com a proteína clatrina. O GcgR internalizado pode ser reciclado, num mecanismo dependente das proteínas Rab-4 e Rab-11, e retornar à membrana plasmática, o que culmina

com a recuperação de sua atividade ou, o GcgR internalizado pode ser degradado nos lisossomos (142).

Os mecanismos envolvidos na degradação e depuração do glucagon ainda não são bem estabelecidos, mas é aceito que os principais órgãos responsáveis por esses processos são o fígado e os rins (129). É conhecido que nem todas as clivagens do glucagon levam a sua eliminação. O glucagon ao ser clivado no sítio das argininas localizadas na 17^a e 18^a posições pela endopeptidase geradora de miniglucagon dá origem a um fragmento biologicamente ativo denominado miniglucagon (MG). Esse processamento ocorre nas células α pancreáticas e na circulação. Diferente do glucagon, o MG não ativa a enzima adenilato ciclase. Trabalhos observaram que o MG é um potente ativador de canais de Ca^{+2} no coração e fígado. Também existem evidências de que o MG em níveis picomolares pode inibir a secreção de insulina estimulada pela glicose pelas células β do pâncreas (143, 144).

A principal aplicação clínica do glucagon é o tratamento emergencial de reações hipoglicêmicas severas em pacientes diabéticos insulino-dependentes. Além disso, o glucagon é utilizado como terapia contra envenenamentos causados por fármacos cardioprotetores, incluindo β -bloqueadores, pois ele aumenta os níveis intracelulares de AMPc no coração. Outra utilização do glucagon na clínica é no exame de radiografia do íleo devido ao seu efeito relaxante no músculo liso intestinal (145).

1.3.1 Efeitos do glucagon na resposta inflamatória

Embora a maior atenção seja dada ao papel do glucagon no metabolismo da glicose, também existem relatos na literatura de que os níveis endógenos de glucagon estejam alterados em pacientes com doenças inflamatórias, tais como asma e sepse (146-148). Esse desequilíbrio nos níveis circulantes de glucagon observados em doenças inflamatórias sugere que o glucagon possa ser importante na regulação da inflamação. Pacientes sépticos não sobreviventes apresentam níveis plasmáticos elevados de glucagon em relação aos sobreviventes. Esse aumento nos níveis de glucagon foi correlacionado com a gravidade da doença, disfunção orgânica e mortalidade observada em pacientes com sepse grave (148). Esta maior gravidade observada em pacientes sépticos não sobreviventes pode estar relacionada às propriedades anti-inflamatórias do glucagon, uma vez que o glucagon é capaz de inibir a produção de superóxido pelas células polimorfonucleares (PMNs) (149) (Figura 1.7).

Pacientes com asma apresentam uma diminuição nos níveis circulantes de glucagon (146). Embora já tenha sido descrita a presença do GcgR nos pulmões (131), pouco ou nada é conhecido sobre os efeitos do glucagon no tecido pulmonar. Já foi descrito que o glucagon é capaz de relaxar o músculo liso de brônquios de cobais *in vitro* (150) (Figura 1.7). Além disso, existem alguns estudos sobre uma possível ação broncodilatadora do glucagon em pacientes asmáticos. Porém, esses estudos são poucos e controversos uma vez que alguns autores sugerem que o glucagon é capaz de relaxar a musculatura lisa das vias aéreas desses pacientes (151, 152), enquanto outros autores não observam efeito algum (153, 154). Uma das células efetoras mais importantes na patogênese da asma são os linfócitos. As células linfoblásticas B e T expressam o GcgR (155) (Figura 1.7), e apesar do glucagon induzir aumento de AMPc através do seu receptor nessas células, ele não interferiu com a proliferação das mesmas (156).

Além disso, o glucagon foi capaz de inibir o edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana (157). Nosso grupo mostrou que o glucagon reduziu o número de mastócitos peritoneais e mesentéricos e diminuiu a liberação de histamina estimulada por alérgenos em fragmentos de tecido subcutâneo de rato *in vitro* (158) (Figura 1.7). Por fim, foi observado que o glucagon é capaz de reduzir a atividade de células *natural killers* (NK) *in vitro* (159) (Figura 1.7).

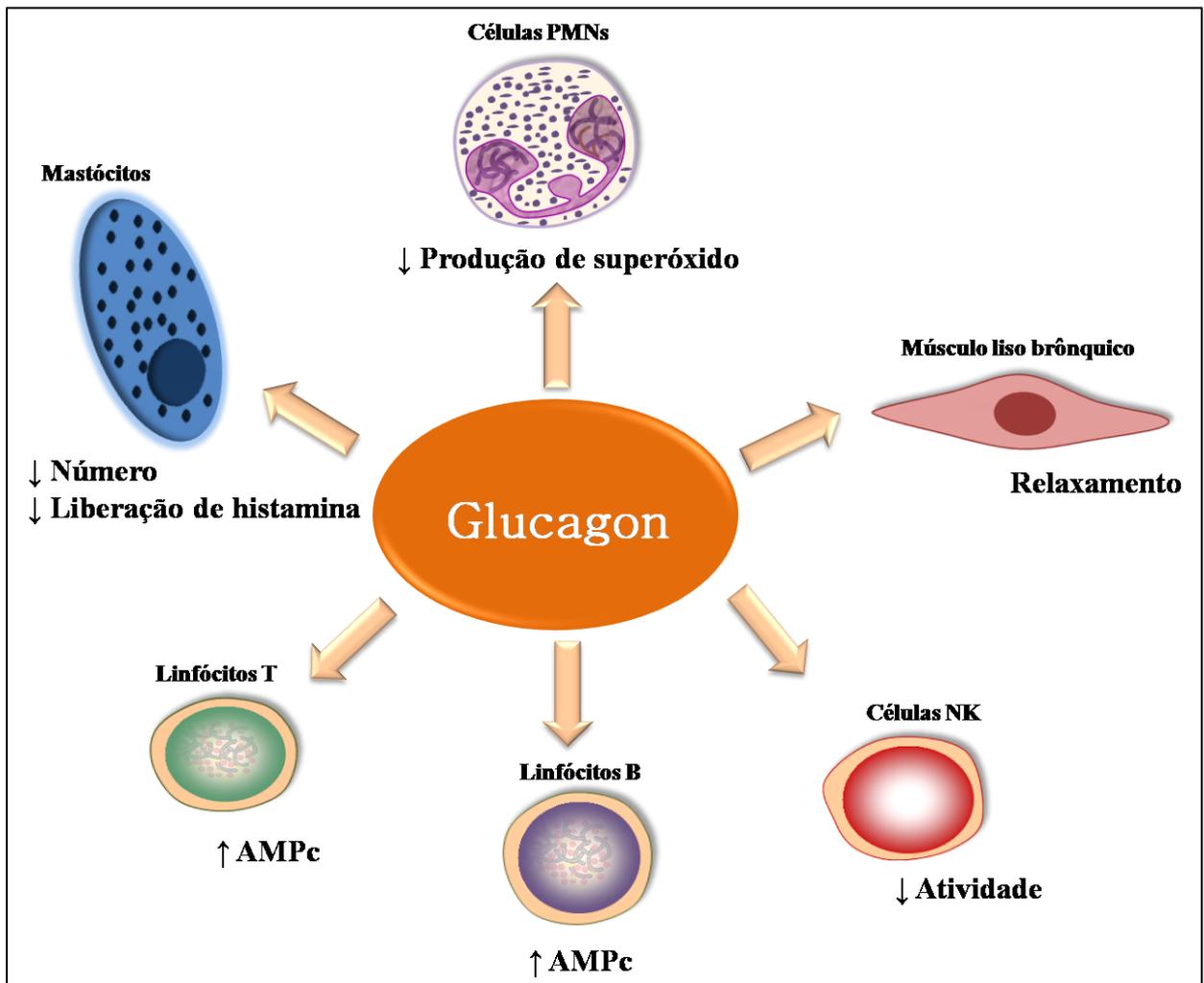


Figura 1.7. Glucagon modula a função e número de células estruturais e inflamatórias. Efeito do glucagon sobre músculo liso brônquico, células NK, linfócitos B e T, mastócitos e células PMNs.

1.4 Hipótese

A ativação do GcgR, cuja expressão já foi descrita em pulmões, leva a um aumento nos níveis intracelulares de AMPc e, este segundo mensageiro provoca o relaxamento do músculo liso das vias aéreas além de inibir alguns elementos da resposta inflamatória. Além disso, alguns efeitos anti-inflamatórios do glucagon sobre leucócitos e células estruturais já foram descritos na literatura. Com isso tudo, formulamos a hipótese de que o glucagon pode possuir um efeito anti-espasmódico e anti-inflamatório em modelos murino de LPA/SDRA e asma.

Acreditamos que o efeito anti-espasmódico do glucagon seja direto sobre a célula muscular lisa das vias aéreas já que a elevação nas concentrações de AMPc nesse tipo celular é um dos principais mecanismos que induzem ao relaxamento. Porém, não descartamos que a ação anti-espasmódica do glucagon possa ocorrer de forma indireta através da liberação de fatores relaxantes pelo epitélio das vias aéreas.

Sabendo que o glucagon é capaz de reduzir a produção de superóxido em células PMNs e que o aumento dos níveis de AMPc nessas células inibe a ativação e recrutamento das mesmas, sugerimos que os PMNs sejam uma das principais células-alvo para o efeito anti-inflamatório do glucagon no modelo murino de LPA/SDRA. Já no modelo murino de asma aguda, propomos que a ação anti-inflamatória do glucagon ocorra diretamente sobre linfócitos T e fibroblastos além de reduzir o recrutamento de eosinófilos para os pulmões, uma vez que são as principais células efetoras do desenvolvimento da inflamação e remodelamento na asma.

Tanto no modelo de LPA/SDRA quanto no de asma aguda, apontamos também a célula epitelial das vias aéreas como um possível alvo para o glucagon exercer seus efeitos anti-inflamatórios através da inibição da secreção de quimiocinas por essas células, visto que são uma das principais células residentes a produzir esses mediadores no curso dessas doenças.

A partir disso tudo, consideramos que com uma melhor compreensão dos efeitos extra-hepáticos do glucagon estaremos gerando subsídios para o maior entendimento das ações deste hormônio no organismo, além de talvez o glucagon poder ser considerado um potencial candidato para ser protótipo de novas drogas para a terapia de pacientes com LPA/SDRA ou asma.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos anti-espasmódico e anti-inflamatório do glucagon em modelos murino de LPA/SDRA e asma e investigar quais são as células alvo desses efeitos do glucagon.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos A/J induzida por estímulo colinérgico *in vitro* e *in vivo* e os possíveis mecanismos moleculares associados;
- Investigar a ação do glucagon sobre a hiper-reatividade e inflamação das vias aéreas em modelomurino de LPA/SDRA induzida por LPS;
- Analisar o efeito do glucagon sobre a quimiotaxia de células polimorfonucleares humanas e sobre a ativação de células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 *in vitro*;
- Estudar a ação do glucagon sobre a hiper-reatividade, inflamação e remodelamento das vias aéreas em modelo murino de asma induzida por ovoalbumina (OVA);
- Determinar o efeito do glucagon sobre a ativação de linfócitos T, fibroblastos pulmonares e de células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 *in vitro*.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da FIOCRUZ e do IOC (Licenças L-030/15; LW – 23/11 e L-027/16). Foram utilizados camundongos A/J machos pesando entre 18 e 25 g. E também foram utilizados camundongos transgênicos DO11.10 com TCR específico para ovalbumina, machos, com peso entre 18 e 25 g. Todos os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada entre 23 a 25°C e acesso livre à ração e água.

3.2. Voluntários saudáveis

Amostras de sangue periférico foram obtidas de voluntários saudáveis de ambos os sexos (50% eram do sexo feminino e 50% eram do sexo masculino) e de idade entre 25 a 30 anos (17% com 25 anos, 17% com 26 anos, 33% com 28 anos e 33% com 30 anos). Doadores que apresentavam qualquer tipo de infecção ou inflamação ou que estavam fazendo uso de medicamento anti-inflamatório ou antibiótico foram excluídos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP, FIOCRUZ), número do protocolo 1.057.012. Todos os experimentos foram executados de acordo com este protocolo. O consentimento para a participação no estudo foi obtido de todos os voluntários saudáveis antes de qualquer procedimento associado ao estudo.

3.3. Avaliação da contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

3.3.1. Sistema de banho de órgão isolado

Camundongos A/J foram submetidos a eutanásia numa câmara saturada de CO₂ e, imediatamente após, o tórax foi aberto para cuidadosa remoção da traqueia. Em seguida, a gordura aderente e o tecido conjuntivo em torno da traqueia foram retirados e duas hastes metálicas de sustentação foram introduzidas na luz da traqueia. Esse conjunto foi transferido para um sistema de banho de órgão isolado constituído por cubas de vidro contendo 10 mL de solução de Krebs (que nutriu os órgãos para que suas funções permanecessem viáveis), mantida a 37°C e areada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Uma das hastes fixou a traqueia na base da cuba e a outra conectou-a a um transdutor isométrico (*Ugo Basile*,

Comerio, Itália) acoplado a um Programa de Aquisição de Dados de Órgão Isolado (*Letica, Software Proto 5*, Versão 7.33, Barcelona, Espanha), para registro de contrações isométricas. As traqueias foram submetidas a uma tensão basal de 1 g e calibradas para que todas apresentassem a mesma tensão de contração inicial.

A preparação permaneceu em repouso por cerca de 60 min para a estabilização da linha de base. Após essa estabilização, as traqueias foram estimuladas com carbacol (2,5 μM) e a resposta contrátil a esse estímulo foi medida para se verificar a viabilidade dessas traqueias (160). Quando as contrações atingiram um platô, cada preparação foi lavada até o relaxamento total da musculatura lisa e, as avaliações descritas a seguir foram iniciadas.

3.3.2. Avaliação do efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

Após ter sido verificada a viabilidade das traqueias através da estimulação com carbacol 2,5 μM , conforme descrito no item acima, essas traqueias foram tratadas com glucagon (0,1 μM ou 1 μM) ou salina estéril, durante 30 min, *in vitro*. Em seguida e ainda em presença do glucagon, foram adicionadas concentrações crescentes de carbacol (0,01 – 100 μM) e as contrações em resposta a cada uma dessas concentrações foram registradas e expressas como percentagem da contração induzida pelo carbacol 2,5 μM . Além disso, também foram calculados os valores da resposta contrátil máxima (E_{max}) ao carbacol e do logaritmo negativo da concentração do carbacol que produz 50% do efeito máximo (pEC_{50}).

3.3.3. Avaliação dos mecanismos de ação associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro*

Um dos mecanismos de ação que poderiam estar envolvidos na ação anti-espasmódica do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueia *in vitro* seria a ativação do epitélio. Dessa forma, para analisar a participação do epitélio, algumas traqueias antes de terem sido transferidas para o sistema de banho de órgão isolado tiveram seus epitélios removidos mecanicamente através da fricção da superfície interna traqueal com uma pinça fina de prata (160), enquanto outras traqueias permaneceram com seu epitélio intacto. Em seguida, todas as traqueias foram inseridas no sistema de banho de órgão isolado e os mesmos procedimentos foram realizados conforme descrito anteriormente.

Para investigar outros possíveis mecanismos de ação associados ao efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*, algumas traqueia foram pré-tratadas com antagonista do

GcgR (des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida, 1 µM) (126) ou com inibidores das enzimas AC (SQ 22 536, 5 µM), NOS (N^o-nitro-L-arginina metil Ester, L-NAME, 100 µM) (160), COX-1(SC-560, 1 µM) (161) ou COX-2 (NS-398, 0,03µM) (162) ou com dimetilsulfóxido (DMSO, 0,1%; veiculo do SC-560 e do NS-398), 30 min antes do tratamento com glucagon (1 µM) *in vitro*. Em seguida, os mesmos procedimentos descritos no item 3.3.2 foram realizados.

3.4. Avaliação do efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo*

Camundongos A/J foram tratados com 25 µL de salina estéril (0,9%, i.n.) ou de glucagon (0,1, 1 ou 10 µg/Kg, i.n.) e 3 h após o tratamento foram anestesiados com nembutal (60 mg/Kg, i.p.) e receberam administração de brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/Kg, i.p.) para bloqueio da atividade neuromuscular. A traqueia foi exposta e uma cânula foi introduzida.

Conforme descrito previamente (163), os animais foram inseridos no sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo (*FinePointe Buxco Platform; Buxco Electronics, Sharon, CT, EUA*) para avaliação da função pulmonar. A cânula introduzida na traqueia foi conectada a um pneumotacógrafo do plestimógrafo para a coleta de dados do fluxo respiratório. Além disso, um cateter preenchido com água foi inserido por via oral para possibilitar a medida da pressão esofágica. Durante 5 min foi realizada a estabilização dos camundongos no sistema e, após esse período, os animais foram aerolizados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e com concentrações crescentes de metacolina (3, 9 e 27 mg/mL). Tanto o PBS 1X quanto cada uma das concentrações de metacolina foram aerolizadas durante 30 seg e agiram durante 5 min(164).

Os parâmetros RL e Cdyn em cada ciclo respiratório foram calculados com base nos sinais de fluxo de ar e de pressão que foram coletados e processados pelo *software BioSystem XA*. Em alguns experimentos, os camundongos foram pré-tratados com 200 µL de L-NAME (20mg/Kg, i.p.) (160), SC-560 (5 mg/Kg, i.p.) (165) ou DMSO (1,6%, i.p., veículo do SC-560) 30 min antes do tratamento com salina estéril (0,9%, i.n.) ou glucagon (1 µg/Kg, i.n.).

3.5. Western blot

3.5.1. Obtenção e processamento das amostras

Para a análise da expressão de CREB-fosforilado (pCREB), CREB total, NOS-3 fosforilada (pNOS-3), NOS-3 total e COX-1, camundongos A/J foram tratados com 25 µL de

glucagon (1 µg/Kg, i.n.) ou de salina estéril (0,9%, i.n.) durante 5, 15, 30, 60, 120 e 180 min. Para a avaliação da expressão do TCRαβ, foram utilizadas amostras de tecido pulmonar de camundongos A/J submetidos a indução de asma aguda por OVA e tratados com 25 µL de glucagon (10 ou 100 µg/Kg, i.n.).

Em seguida, todos esses animais foram submetidos a eutanásia com barbitúrico tiopental em dosagem letal (500 mg/Kg, i.p.) e a artéria aorta abdominal foi exposta e cortada para a liberação do sangue retido. Foi iniciada a técnica de perfusão para remover o sangue presente nos pulmões. Essa técnica consistiu na inserção de um escalpe no ventrículo direito do coração por onde foi administrada a solução de perfusão constituída por salina não estéril (0,9%) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; 20 mM). Um dos lobos do pulmão direito foi removido, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a temperatura de -80°C até o uso.

Posteriormente, o lobo pulmonar foi homogenizado em 500 µL de tampão de lise gelado constituído por um coquetel de inibidores de proteases (*Complete*, F. Hoffmann-LaRoche Ltd) e 0,1% de Triton X-100 em PBS 1X. Os macerados foram centrifugados a 13.000 x g durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos.

3.5.2. Quantificação de proteína totais pelo método do BCA

A partir dos sobrenadantes obtidos como descrito no item acima (3.5.1) foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método do ácido bicínico (BCA; *Sigma-Aldrich Corp., St Louis*, EUA). O método do BCA consiste na capacidade das proteínas de reduzirem o íon cobre (II) a íon cobre (I) em meio alcalino, e desse íon cobre (I) interagir com o BCA formando um complexo de coloração púrpura. Esse complexo é estável, solúvel em água, possui absorvância máxima a 562 nm e a intensidade da sua cor aumenta de forma diretamente proporcional à concentração de proteínas(166).

Para a realização do método de BCA, 20 µL de água destilada e 5 µL de amostra ou da curva padrão foram adicionadas em duplicata em uma placa de 96 poços transparente de fundo chato. Para a curva padrão de proteína foram utilizadas 6 diluições de albumina de soro bovino (BSA, 25, 125, 250, 500, 750 e 1000 µg) e o branco (somente água destilada). Posteriormente foram adicionados em cada poço 200 µL de uma solução constituída por 50 partes da solução do BCA (*kit Sigma Aldrich*) com 1 parte da solução de sulfato de Cobre (II) (4%). A placa foi incubada em uma estufa a 60°C durante 15 min. Após esse período, a reação foi lida numa leitora de placas (*SpectraMax M5-Molecular Devices*) no comprimento de onda

de 562 nm. A concentração de proteínas presentes no sobrenadante foi determinada por comparação com a curva padrão da BSA.

3.5.3. Separação das proteínas por eletroforese

Cinquenta µg (para o TCRαβ) e 100 µg (para pCREB, CREB total, pNOS-3, NOS-3 total e COX-1) de proteínas totais de cada amostra foram adicionados a um tampão de amostra dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) e esse conjunto foi aquecido a 95°C por 5 min. Em seguida, essas amostras contendo o tampão *SDS-PAGE* foram aplicadas em géis de poliacrilamida 10% e a eletroforese foi realizada num sistema de corrida eletroforética (*Bio- Rad Laboratories Inc.*, China) contendo tampão corrida sob uma voltagem de 110V por um tempo aproximado de 120 min.

3.5.4. Transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose

As proteínas separadas nos géis foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*GE Healthcare, Little Chalfont, UK*) através de um sistema de transferência semi-úmida (*Bio- Rad Laboratories Inc.*, China). Para a montagem desse sistema de transferência, os componentes foram previamente embebidos num tampão de transferência 1X e colocados na seguinte ordem: 3 papéis de filtro finos (*Bio- Rad Laboratories Inc.*, China) na parte inferior do aparelho, em cima desses papéis foi colocada a membrana de nitrocelulose, sobre a membrana foi inserido o gel e em cima do gel foram colocados outros 2 papéis de filtro.

A transferência ocorreu numa corrente elétrica de 70 A por membrana e uma tensão constante de 25 V durante 75 min.

3.5.5. Bloqueio, imunodeteção e revelação

Após a transferência, as membranas foram incubadas com uma solução de leite em pó desnatado (5%) em tampão tris salina-*Tween-20* (TBST) por 1 h a temperatura ambiente para bloqueio dos sítios não específicos das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBST a temperatura ambiente por 5 min e foram expostas aos anticorpos primários policlonais feitos em coelho anti-CREB total, anti-NOS-3 total, anti-NOS-3 fosforilada (1:500 em TBST; *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*) ou anti-COX-1 (1:100 em TBST; *Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA*) ou aos anticorpos monoclonais feitos em camundongos anti-CREB fosforilado (1:500 em TBST; *Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA*), anti-TCRαβ

(1:100 em TBST; *MyBioSource*, CA, EUA) ou anti- β -actina (1:1000 em TBST; *Santa Cruz Biotechnology*, CA, EUA) *overnight* a 4°C sob agitação suave.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes com TBST durante 5 min cada lavagem e então foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente e sob agitação suave com os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados à enzima peroxidase (1:10.000 em TBST; *R&D Systems*, MN, EUA). No caso da incubação prévia com os anticorpos primários anti-COX-1 e anti- β -actina, os anticorpos secundários utilizados foram anti-coelho ou anti-camundongo conjugados a fluoróforos (1:10.000 em TBST; *LI-COR Corporate*, Lincoln, NE, EUA).

Após o término da incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada cinco vezes em TBST por 5 min e uma vez com TBS 1X por 5 min cada lavagem.

Para os anticorpos secundários conjugados a enzima peroxidase, a expressão das proteínas foi detectada em uma câmara escura onde as membranas foram expostas a um reagente de quimioluminescência (*SuperSignal West Dura*, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Rockford, EUA), e em sequência a um filme fotossensível (*Kodak*, *Perkin Elmer Life Sciences*, EUA) que capturou a luz emitida pela reação de quimioluminescência. Os filmes obtidos foram escaneados (*HP Officejet Pro 8500 A910*, EUA).

Já para os anticorpos secundários conjugados a um fluoróforo, a revelação foi feita por fluorescência no aparelho *Odyssey Image System* (*LI-COR Corporate*, Lincoln, NE, EUA). Nesse caso, o anticorpo secundário que estava marcado com um fluoróforo foi excitado pelo aparelho *Odyssey* e emitiu uma cor no local onde esse anticorpo havia se ligado.

As bandas foram analisadas através do software *Image Pro Plus* versão 6.2 (*Media Cybernetics In*, Bethesda, MA, EUA), onde o número de pixels em cada banda foi determinado.

3.6. Quantificação de PGE₂

Camundongos A/J foram tratados i.n. com 25 μ L de glucagon (1 μ g/Kg) ou de salina estéril (0,9%) e após 15, 30, 60, 120 e 180 min do tratamento com glucagon, foram submetidos a eutanásia com uma injeção i.p. de barbitúrico tiopental em dosagem letal (500 mg/Kg). Posteriormente, foi realizada a técnica de perfusão conforme descrito no item 3.5.1.

Ao final da perfusão, o pulmão inteiro foi retirado e homogenizado em 500 μ L de tampão de lise gelado constituído por um coquetel de inibidores de proteases (*Complete*, *F. Hoffmann-LaRoche Ltd*) e 0,1% de Triton X-100 em PBS 1X. Os macerados foram

centrifugados a 13.000 x g durante 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos. A partir dos sobrenadantes foi realizada a quantificação de PGE₂ através de ensaio imunoenzimático (EIA) de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical).

3.7. Análise do efeito do glucagon sobre a ativação de células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 *in vitro*

Células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 foram mantidas em garrafas grandes em meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB; 10%), penicilina (1x10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL) a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Quando a condição de 90% de confluência era atingida, as células eram submetidas ao processo de tripsinização (tripsina 1,25 g/mL + EDTA 0,2 g/mL) e era realizada a passagem da cultura celular. A partir da terceira passagem os experimentos foram realizados.

As células foram plaqueadas (1 x 10⁵ células/poço) em placas de 24 poços em meio DMEM suplementado com SFB (10%), penicilina (1x10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL). Após as células atingirem a confluência em torno de 80 a 90%, o meio com SFB (10%) foi retirado e foi adicionado DMEM sem SFB. As células foram tratadas com dexametasona (1 µM) ou glucagon (0,003 - 1 µM) durante 30 min *in vitro*. Em seguida, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/µL) ou IL-13 humana (12 ng/mL) durante 24 h *in vitro*. A placa foi centrifugada a 100 x g durante 5 min a 4°C e, a partir do sobrenadante foram quantificados IL-8 das células estimuladas com LPS ou eotaxina (Eot)-2 das células estimuladas com IL-13 através da técnica de Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA), conforme as recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA).

3.8. Avaliação do efeito do glucagon sobre a quimiotaxia de polimorfonucleares humanos *in vitro*

3.8.1. Isolamento de células PMNs a partir de amostras de sangue

Vinte mL de sangue foram colhidos de voluntários saudáveis a partir de punção venosa utilizando um escalpe de 21G conectado a uma seringa contendo 0,375 mL de heparina sódica (10 UI/mL). O sangue foi transferido para um tubo de 50 mL, ao qual foi adicionado dextran 2% e foi mantido dessa forma durante 1 h em temperatura ambiente para sedimentação das hemácias. Em seguida, o sobrenadante resultante da sedimentação foi recolhido, centrifugado a 351 x g por 5 min a 20°C e o *pellet* foi ressuspensão em 25 mL de

solução hipotônica (NaCl a 0,2%), para a lise de hemácias restantes. Após 20 s, foram adicionados 25 mL de solução NaCl a 1,6% para o reestabelecimento da osmolaridade. Em seguida, foi realizada centrifugação a 351 x g por 5 min a 20°C e, o *pellet* foi ressuspensão em solução salina balanceada de *Hanks* (HBSS) sem cálcio nem magnésio contendo albumina sérica humana 0,5% (HBSS/A). A essa suspensão celular foram adicionados 6 mL de *Ficollpaque* (Amersham, Pharmacia Fine Chemicals Inc., New Jersey, EUA) e foi realizada uma centrifugação diferencial a 351 x g por 30 min a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, constituído principalmente por células PMNs, foi ressuspensão em 5 mL de HBSS/A. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio óptico (BX40; Olympus, Center Valley, PA) após diluição na solução do corante *Turk* (ácido acético 2%).

Além de terem sido utilizados no ensaio de quimiotaxia *in vitro* (descrito no item subsequente), os PMNs isolados também foram marcados com anti-Gcgr conjugado a ficoeritrina (PE; 1:20) (Bioss Antibodies, Woburn, MA, EUA) durante 30 min a 4 °C para análise da expressão do Gcgr nessas células. Em seguida, os PMNs foram distinguidos e contados em um citômetro de fluxo (FACSCalibur; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EUA) que adquiriu 3.000 eventos por região. O controle de isotipo foi usado para controlar a ligação inespecífica do anticorpo. Todas as aquisições foram analisadas com o programa *FlowJo software* (Tree Star, Inc.).

3.8.2. Quimiotaxia de PMNs *in vitro*

Os PMNs isolados (1×10^6 células/poço) foram marcados com acetometoxi da calceína (calceína AM, 5 μ M) durante 30 min a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂ ao abrigo de luz. A calceína AM atravessa passivamente a membrana celular e é convertida por esterases intracelulares em seu análogo negativo, impermeável e de fluorescência verde conhecido como calceína. Essas esterases estão ativas somente nas células integras, por isso, a calceína AM é uma ferramenta utilizada na biologia para marcação de células vivas (167, 168).

Após 3 lavagens com HBSS, as células foram tratadas por 1 h com rolipram (5 μ M, diluído em DMSO 0,01%) ou glucagon (0,03 – 3 μ M) *in vitro* e mantidas a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂.

A capacidade dos PMNs migrarem em resposta a um estímulo foi avaliada em placa de 96 poços de quimiotaxia *Neuroprobe ChemoTx® 101-5* (Neuro Probe, Gaithersburg, Maryland, EUA) constituída por um filtro de nitrocelulose com poros de 5 μ m de diâmetro que separa 2 compartimentos: um inferior e um superior. No compartimento inferior foram

colocados o meio de cultura RPMI com 0,5% de albumina sérica humana (ASH), o estímulo quimiotático IL-8 humana (100 ng/mL) diluído em RPMI-ASH ou uma curva padrão de células marcadas com calceína AM ($0,25 \times 10^5$ a 2×10^5 células). No compartimento superior foram colocados 20 μ L contendo 2×10^5 células de cada tratamento. Em seguida, a placa de quimiotaxia foi incubada durante 2 h a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂.

Após esse período, o filtro foi retirado e o compartimento inferior da placa foi lido numa leitora de placas (*SpectraMax M5-Molecular Devices*) num comprimento de onda de excitação de 485nm e de emissão de 530nm (167). A quantidade de células que migraram foi obtida por comparação com a curva padrão de células. Os resultados foram expressos como percentual de células que migraram após estimulação com IL-8 humana. Essa percentagem foi obtida comparando o número total de PMNs presentes no compartimento inferior da placa após 2 h de incubação com IL-8 e o número total de células inseridas no compartimento superior da placa no início do experimento (2×10^5 células em 20 μ L), o que representou 100% de células.

3.8.3. Ensaio de viabilidade dos PMNs tratados com glucagon *in vitro*

O ensaio de viabilidade foi realizado em placas de 24 poços onde foram adicionados PMNs isolados (1×10^5 células/poço) de sangue periférico humano num volume final de 300 μ L de meio RPMI sem SFB. As células foram tratadas com salina estéril (0,9 %) ou glucagon (0,03 – 3 μ M) *in vitro* e mantidas a 37°C numa atmosfera de 5% CO₂. Após 3 e 24 h do tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão com o corante Tripán a 0,2% em HBSS (169). Nesse ensaio, as células foram contadas em câmara de Neubauer e microscópio óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*) e aquelas que apresentaram coloração azul em seu interior foram consideradas não-viáveis. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis.

3.9. Análise da ação do glucagon sobre a proliferação, secreção de citocinas e população de linfócitos *in vitro*

Os linfonodos cervicais, axilares e inguinais de camundongos transgênicos DO11.10 com TCR específico para OVA ou de camundongos A/J foram retirados e macerados com uma peneira plástica (*cell strainer 40 μ m, BD Pharmingen*) em uma placa de *petri* contendo 1 mL de DMEM suplementado (Aminoácido não essencial 0,1 mM; Aminoácido essencial 0,05 mM; Vitaminas 0,1 mM; Hepes 0,1 mM; L-Glutamina 2 mM; β -mercaptoetanol 55 μ M,

penicilina 1×10^6 U/mL; estreptomicina 0,2 g/mL e SFB 10%). O macerado foi centrifugado a $433 \times g$ durante 10 min a 4°C e, em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL do DMEM suplementado e coradas com azul de tripan 0,2% para contagem em câmara de Neubauer e microscópio óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*).

As células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços (1×10^6 células/poço) em DMEM suplementado, tratadas com dexametasona ($1\mu\text{M}$) ou glucagon ($0,03 - 10 \mu\text{M}$) *in vitro* e os estímulos foram adicionados concomitantemente ao tratamento. Para as células obtidas a partir dos linfonodos dos camundongos DO11.10, o estímulo utilizado foi a OVA ($0,5 \text{ mg/mL}$) *in vitro*. Enquanto que para as células provenientes de camundongos A/J, o estímulo foi o anti-CD3 (10 mg/mL ; *BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) *in vitro*. Em ambos os casos, as células permaneceram com o tratamento e o estímulo durante 72 h a 37°C numa atmosfera de 5% CO_2 .

A análise da proliferação foi realizada através da permeabilização e marcação das células com iodeto de propideo (PI) conforme descrito em trabalho anterior (170). Para essa análise, após as 72 h de tratamento e estímulo, as células foram recolhidas, centrifugadas ($240 \times g$, 4°C por 5 min) e resuspendidas em 200 μL de tampão contendo PI e um detergente não-iônico denominado NP-40 (*Calbiochem, San Diego, CA, EUA*). As células foram incubadas no escuro a 8°C , durante 15 min. A avaliação do conteúdo de DNA foi feita através da coleta de 10.000 eventos em um citômetro de fluxo (*FACSCalibur; BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) e da análise das aquisições no software *CellQuest* (*BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*). Os valores de proliferação foram determinados calculando a percentagem de células na fase S + G2 do ciclo celular. Para análise da viabilidade das células, uma alíquota de suspensão celular foi misturada com solução de azul de tripan (0,2%) e as células foram contadas em câmara de *Neubauer* e microscópio óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*).

Além disso, 72 h após a estimulação com anti-CD3 foram quantificadas as citocinas do sobrenadante através de citometria de fluxo (*FACSCalibur; BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) utilizando um kit *Cytometric Bead Array* (CBA; *BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) de acordo com as instruções do fabricante, na plataforma de citometria de fluxo do IOC.

Finalmente, as células obtidas dos linfonodos de camundongos DO11.10 após 72 h do tratamento com glucagon e estimulação com OVA *in vitro* foram incubadas com soro de carneiro durante 15 min a 4°C para bloqueio das ligações inespecíficas. Após lavagem com

PBS 1X, essas células foram marcadas com uma combinação apropriada de anti-CD3 conjugado a fluoresceína isotiocinato (FITC; 1:50) e anti-CD4 conjugado a PE (1:100) (*BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) durante 30 min a 4°C. Em seguida, essas células foram distinguidas e contadas em um citômetro de fluxo (*FACSCalibur; BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) que adquiriu 10.000 eventos por região após compensação apropriada das cores. Controles de isotipos foram usados para controlar a ligação inespecífica dos anticorpos. Todas as aquisições foram analisadas com o programa *FlowJo software (Tree Star, Inc.)*.

3.10. Avaliação do efeito do glucagon sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares *in vitro*

3.10.1. Cultura primária de fibroblastos pulmonares

Camundongos A/J foram submetidos a eutanásia numa câmara saturada de CO₂ e, imediatamente após, foi inserido um escalpe no ventrículo direito do coração para a realização da técnica de perfusão utilizando PBS 1X estéril. Os pulmões foram retirados e submetidos à dissociação mecânica e, posteriormente uma digestão enzimática com colagenase tipo I (1 mg/mL) em meio DMEM sem SFB durante 1 h a 37°C. O digerido obtido foi centrifugado a 504 x g durante 10 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspensão e plaqueado em garrafas médias (75 cm²) e acrescidas de meio DMEM suplementado com SFB (10%), penicilina (1 x 10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL). Quando a condição de 90% de confluência era atingida, as células eram submetidas ao processo de tripsinização (tripsina 1,25 g/mL + EDTA e 0,2 g/mL). A cultura foi expandida em garrafa grande (150 cm²) a partir da terceira passagem e, os experimentos foram realizados entre a quarta e oitava passagens.

3.10.2. Ensaio de proliferação de fibroblastos pulmonares *in vitro*

Fibroblastos pulmonares provenientes do cultivo celular descrito acima foram plaqueados (1,25 x 10⁴ células/poço) em placas de 24 poços em meio DMEM suplementado com SFB (2%), penicilina (1 x 10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL). Vinte e quatro horas após, o meio foi substituído por DMEM sem SFB e os fibroblastos foram tratados com glucagon (0,1 - 10 µM) *in vitro* durante 1 h. Em seguida, as células foram estimuladas com IL-13 murina (40 ng/mL) *in vitro*. Após 20 h de estimulação, foram adicionados a cada poço 0,5 µCi de timidina-3H (*Methyl-3H-Thymidine; Amershan*) e, após 4 horas, as placas foram congeladas à -20°C. Na etapa seguinte, foram realizadas sucessivas lavagens com água

destilada no sistema *Cell Harvester* (PerkinElmer) e, as amostras foram transferidas para um filtro que retém moléculas de um tamanho igual ou superior ao DNA celular. Este filtro foi transferido para um recipiente contendo 4,5 mL de líquido de cintilação (*Invitrogen*) e posterior leitura em contador beta (*MicroBeta2TM*; PerkinElmer) para avaliação da taxa de timidina-3H incorporada ao DNA celular.

3.11. Modelos murinos de inflamação pulmonar

3.11.1. Modelo de LPA/SDRA

Camundongos A/J foram tratados uma única vez com 25 µL de salina estéril (0,9%, i.n.) ou de glucagon (1 µg/Kg, i.n.) e 1 h após foram estimulados com uma única instilação de salina estéril (0,9%) ou LPS (25 µg/25µL). As análises foram realizadas 18 h após a instilação de LPS ou salina (Figura 3.1).

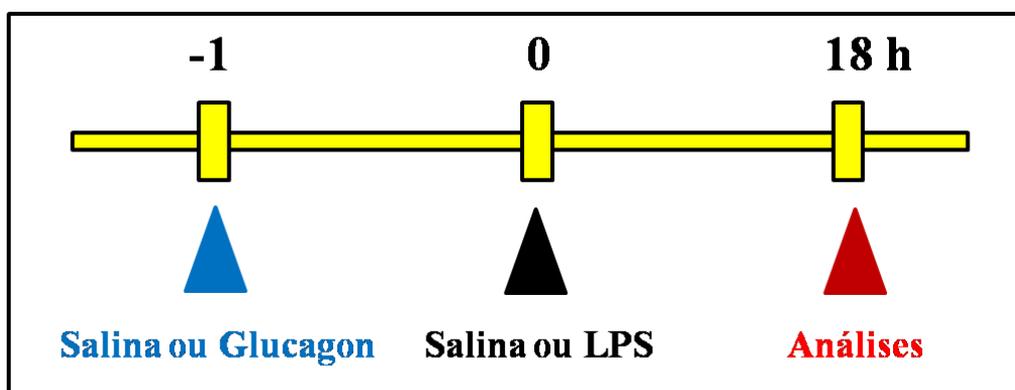


Figura 3.1: Protocolo experimental da indução de LPA/SDRA em camundongos A/J e esquema de tratamento com glucagon. A LPA/SDRA foi induzida por uma única administração i.n. de LPS (25 µg/25 µL de salina estéril), indicada pelo triângulo preto. O tratamento com glucagon (1 µg/Kg, i.n.), indicado pelo triângulo azul, foi realizado 1 h antes do estímulo com LPS. As análises, indicadas pelo triângulo vermelho, foram realizadas 18 h após a instilação de LPS.

3.11.2. Modelo de Asma Aguda induzida por OVA

Camundongos A/J foram sensibilizados com uma injeção s.c. de 50 µg de OVA e 5 mg de hidróxido de alumínio. Após 14 dias, um reforço na sensibilização foi realizado através do mesmo protocolo. No 19º dia após a sensibilização, os animais foram tratados com 25 µL de salina estéril (0,9%, i.n.) ou de glucagon (10 ou 100 µg/Kg, i.n.) uma vez ao dia, durante 2 dias consecutivos. Os animais foram desafiados i.n. com salina estéril (0,9%) ou OVA (25 µg/25 µL) 1 h após cada tratamento. As análises foram realizadas 24 h após o último desafio com OVA, o que correspondeu ao 21º dia após a sensibilização (Figura 3.2).

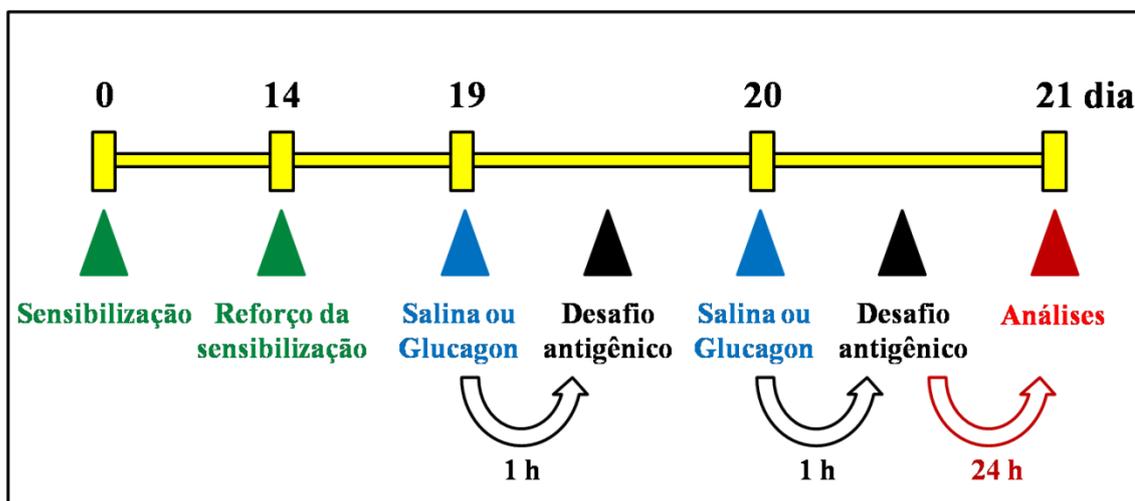


Figura 3.2: Protocolo experimental da indução de asma aguda em camundongos A/J e esquema de tratamento com glucagon. A asma foi induzida através da sensibilização e desafio com OVA. Os animais foram sensibilizados por via s.c. no dia 0 com uma solução contendo OVA e hidróxido de alumínio, indicado pelo triângulo verde. Após 14 dias, esse procedimento de sensibilização foi repetido (reforço), indicado pelo triângulo verde. No dias 19 e 20 após a sensibilização, os animais foram desafiados com OVA (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ de salina estéril, i.n.) uma vez a cada dia, indicado pelo triângulo preto. O glucagon (10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.n) foi administrado 1 h antes de cada desafio intranasal com OVA, indicado pelo triângulo azul. As análises foram realizadas 24 h após o último estímulo i.n. com OVA (dia 21 após a sensibilização), indicadas pelo triângulo vermelho.

3.12. Avaliação do efeito do tratamento com glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas

A hiper-reatividade das vias aéreas foi determinada como sendo a alteração na função das vias aéreas em resposta a metacolina após a instilação com LPS ou OVA. Dezoito horas após a estimulação com LPS e 24 h após o último desafio com OVA, o anestésico nembutal (60 mg/Kg i.p.) e o bloqueador neuromuscular brometo de pancurônio (Pavulon®, 1 mg/Kg, i.v.) foram administrados nos camundongos. Em seguida, a traqueia desses animais foi exposta e nela foi introduzida uma cânula. Os camundongos com a cânula traqueal foram inseridos no sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo (*FinePointe Buxco Platform; Buxco Electronics, Sharon, CT, EUA*) e os mesmos procedimentos descritos para esse pletismógrafo no item 3.4 foram efetuados.

Ao final do processo, os animais foram submetidos a eutanásia com dose letal de barbitúrico tiopental (500 mg/Kg, i.p.), o BAL foi realizado, em sequência o linfonodo mediastinal foi removido e foi executada a técnica de perfusão dos pulmões com salina não estéril (0,9%) e EDTA (20 mM). O pulmão esquerdo foi imerso no fixador *Milloning* e

posteriormente submetido ao processamento histológico. Os lobos do pulmão direito foram separados e congelados a -20°C para análises posteriores.

3.13. Lavado broncoalveolar

Duas lavagens broncoalveolares consecutivas foram realizadas utilizando 0,75 mL de uma solução de PBS 1X + EDTA (10 mM). Após, o lavado foi centrifugado a $300 \times g$ por 10 min a 4°C, o *pellet* foi ressuspensso em 250 μ L da mesma solução de lavagem. A contagem dos leucócitos totais presentes no BAL foi realizada em câmara de *Neubauer* e microscópio óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*) após diluição das amostras na solução do corante *Turk* (ácido acético 2%). As contagens diferenciais das células foram realizadas em microscópio óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*) a partir de citoesfregaços centrifugados a uma rotação de $47 \times g$ por 5 min e corados pelo método de *May-Grunwald-Giemsa*.

Para o modelo de LPA/SDRA, a partir do sobrenadante obtido após a centrifugação do lavado foram quantificados os níveis de TNF- α através do método de ELISA conforme as recomendações do fabricante (*R&D Systems, EUA*).

No modelo de asma aguda induzida por OVA, as células obtidas do BAL também foram incubadas durante 15 min a 4°C com soro de carneiro para bloqueio das ligações inespecíficas e, após lavagem com PBS 1X, essas células foram marcadas com uma combinação apropriada de anti-CD3 conjugado a FITC (1:50), anti-CD4 conjugado a alofocianina (APC; 1:150), anti-CD8 conjugado a ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5; 1:100) (*BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) e anti-GcgR conjugado a PE (1:20) (*Bioss Antibodies, Woburn, MA, EUA*) durante 30 min a 4°C. Em seguida, essas células foram analisadas em um citômetro de fluxo (*FACSCalibur; BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) que adquiriu 10.000 eventos por região após compensação apropriada das cores. Controles de isotipos foram usados para controlar a ligação inespecífica dos anticorpos. Todas as aquisições foram analisadas com o programa *FlowJo software (Tree Star, Inc.)*.

3.14. Marcação das células obtidas do linfonodo mediastinal

No modelo de asma aguda induzida por OVA, o linfonodo mediastinal de cada animal foi retirado e macerado com uma peneira plástica (*cell strainer 40 μ m, BD Pharmingen*) em uma placa de *petri* com 1mL de DMEM suplementado (penicilina 1×10^6 U/mL; estreptomicina 0,2 g/mL e SFB 10%). O macerado foi centrifugado a $433 \times g$ durante 10 min

a 4°C e, em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL do DMEM suplementado. As amostras foram diluídas na solução do corante *Turk* (ácido acético 2%) para a contagem do número de células totais em cada linfonodo mediastinal em câmara de *Neubauer* e microscópio óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*).

Em seguida, as células foram incubadas com soro de carneiro durante 15 min a 4°C para bloquear ligações inespecíficas. Após lavagem com PBS 1X, as células foram incubadas durante 30 min a 4°C com uma combinação apropriada de anti-CD3 conjugado a FITC (1:50), anti-CD4 conjugado a APC (1:150), anti-CD8 conjugado a PE-Cy5 (1:100) (*BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*) e anti-GcgR conjugado a PE (1:20) (*Bioss Antibodies, Woburn, MA, EUA*). Após essa marcação, as células foram distinguidas e contadas em um citômetro de fluxo (*FACSCalibur; BD Biosciences PharMingen, San Jose, CA, EUA*). No citômetro de fluxo, primeiro foi realizada a compensação apropriada das cores e então foram adquiridos 10.000 eventos por região. Para controlar a ligação inespecífica dos anticorpos foram utilizados controles de isotipos. Todas as aquisições foram analisadas com o programa *FlowJo software (Tree Star, Inc.)*.

3.15. Quantificação de citocinas nos pulmões

No modelo de asma aguda induzida por OVA, um dos lobos do pulmão direito foi homogenizado em 1 mL de uma solução gelada constituída por PBS 1 X, 0,1% de Triton X-100 e um coquetel de inibidores de proteases (*Complete, F. Hoffmann-LaRoche Ltd*). Os macerados foram centrifugados a 13.000 x g durante 10 min a 4°C e a partir deles foram quantificados os níveis de IL-4, Eot-1 e Eot-2 através da técnica de ELISA, seguindo as recomendações do fabricante (*R&D Systems, EUA*). Os resultados foram expressos como µg/mg de proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método do BCA já descrito no item 3.5.2.

3.16. Ensaio da atividade da peroxidase eosinofílica no pulmão

O ensaio da atividade da EPO é um método bem estabelecido e preciso para medir o número de eosinófilos em amostras biológicas (171). Esse método permite quantificar a reação das peroxidases secretadas pelos eosinófilos através de uma medida de absorvância óptica (172).

O ensaio da EPO foi realizado conforme descrito anteriormente por Humbles e colaboradores (173). No modelo de asma aguda induzida por OVA, um dos lobos do pulmão

direito foi homogenizado em HBSS (5%) a 4°C. O macerado foi centrifugado a 960 x g durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 500 µL de solução hipotônica (NaCl a 0,2%) para a lise de hemácias. Após 30 s foram adicionados 500 µL de solução NaCl a 1,6% para o reestabelecimento da osmolaridade. Novamente foi realizada centrifugação a 960 x g por 10 min a 4°C e o *pellet* foi ressuspensão em HBSS (5%) contendo brometo de hexadecil-trimetil-amônio a 0,5%.

Três ciclos sucessivos de congelamento (em nitrogênio líquido) e descongelamento (em água a 45°C) foram realizados, e após centrifugação (1090 x g durante 10 min a 4°C), cada amostra foi colocada em duplicata (75 µL/poço) numa placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 150 µL do substrato constituído por o-fenildiaminadiidrocloreto (1,5 mM) em Tris-HCl (0,05 M; pH 8,0) suplementado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 6,6 mM). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico a 4 M e a reação foi lida numa leitora de placas (*SpectraMax M5-Molecular Devices*) no comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram representados como atividade da EPO em termos de absorvância a 492 nm por µg de proteína em cada amostra. A proteína foi quantificada pelo ensaio BCA conforme já descrito no item 3.5.2.

3.17. Histologia

Vinte e quatro horas após o último desafio i.n. com OVA, o pulmão esquerdo foi fixado em solução *Milloning* para preservação da estrutura pulmonar. Após 48 h na solução de fixação, os órgãos passaram por procedimento de desidratação em banhos com concentrações crescentes de etanol e clarificação em xilol para remoção do álcool. Em sequência, foi realizada a impregnação com parafina no tecido, confecção dos blocos de parafina e cortes histológicos de 5 µm de espessura. Os cortes histológicos foram utilizados para imunohistoquímica ou foram submetidos a diferentes tipos de coloração.

3.17.1. Imunohistoquímica

A análise da expressão do GcgR em pulmões de camundongos A/J desafiados i.n. com OVA ou salina estéril foi realizada através da metodologia de imunohistoquímica. Para isso, os cortes histológicos de 5 µm foram acondicionados em lâminas filmadas com solução de silane a 4% diluído em acetona, o que permitiu uma melhor aderência do tecido na lâmina.

Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa a 60°C por 1 hora e receberam 2 banhos em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram

hidratados com banhos de etanol em concentrações decrescentes até a incubação em água destilada por 10 min. A etapa seguinte foi de recuperação antigênica, que visou aumentar a capacidade de reconhecimento dos epítomos dos antígenos pelos anticorpos no ensaio. Para isso, as lâminas foram incubadas em tampão citrato de sódio (5 mM) em temperatura de 95°C por 15 min. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens com TBST por 5 min cada e o material foi incubado por 20 min com solução H₂O₂ a 3% em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas e minimização de marcações inespecíficas. Outro bloqueio, de ligações inespecíficas dos anticorpos a receptores Fc presentes no tecido estudado, foi feito através de incubação dos cortes com solução de BSA 2,5%, leite em pó desnatado a 1% e SFB a 8% em TBST por 3 horas.

Após o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário policlonal de coelho para o GcgR (1:100 em TBST com BSA a 1%; Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA) *overnight* a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados 2 vezes com TBST, por 5 min cada lavagem, e foram incubados com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado a enzima peroxidase (1:100 em TBST; *R&D Systems*, MN, EUA) por 2 h 30 min a temperatura ambiente. A revelação foi feita após nova lavagem do material com TBST e incubação por 20 min com o substrato aminoetilcarbazol (AEC). As lâminas foram lavadas em água corrente e depois contra-coradas com hematoxilina de *Mayer* por 10 s para visualização da estrutura do pulmão. Em seguida, as lâminas foram montadas com solução de gelatina/glicerina e lamínulas e digitalizadas por um scanner (*Pannoramic SCAN150*, *3D Histech*, Budapeste, Hungria).

Em cada pulmão foram capturadas 7 imagens dos bronquíolos e da área peribronquiolar em magnificação de 25x através do *software Pannoramic Viewer 1.15.4* (*3D Histech*, Budapeste, Hungria). O número de pixels em cada imagem capturada marcados positivamente para a reação de imunohistoquímica foi determinado por análise no *software Image Pro Plus* versão 6.2 (*Media Cybernetics Inc*, Bethesda, MA, EUA). Dessa forma, foi possível expressar a presença do antígeno de interesse em pixels por unidade de área (μm^2) do tecido estudado.

3.17.2. Análise do infiltrado celular no tecido pulmonar

Cortes histológicos de 5 μm dos pulmões foram submetidos a coloração de *Sirius Red* (ph = 10,2) para a análise do infiltrado leucocitário na região peribronquiolar. A quantificação do número de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares foi realizada em microscópio

óptico (*BX40; Olympus, Center Valley, PA*) com o auxílio de um retículo morfométrico acoplado a ocular do microscópio. O retículo morfométrico possui área conhecida de $10^4 \mu\text{m}^2$ no aumento final de 1000x e foi posicionado nas regiões peribronquiolares de forma aleatória (163). Foram analisados 3 diferentes campos por bronquíolo e 7 bronquíolos por animal.

3.17.3. Análise da deposição da matriz extracelular nas regiões peribronquiolares

Os cortes histológicos de 5 μm dos pulmões foram submetidos a coloração com Tricrômio de Masson, cuja reação confere às fibras colágenas uma coloração com tonalidade que varia entre azul e verde. As lâminas foram digitalizadas por um scanner *Pannoramic SCAN150 (3D Histech, Budapeste, Hungria)*. Imagens de 10 bronquíolos por animal foram capturadas em magnificação de 20x através do *software Pannoramic Viewer 1.15.4 (3D Histech, Budapeste, Hungria)*. Para quantificação do número de pixels em cada imagem capturada, delimitamos apenas a região que circundava a membrana basal dos bronquíolos, excluindo o epitélio bronquiolar, e identificamos padrões específicos de coloração azul-esverdeada como sendo marcação positiva para o Tricrômio de Masson. Essa análise foi realizada utilizando o *software Image Pro Plus versão 6.2 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MA, EUA)*.

3.18. Soluções

3.18.1. Solução final de Krebs

- Cloreto de sódio (NaCl) a 118 mM
- Cloreto de potássio (KCl) a 4,8 mM
- Cloreto de cálcio (CaCl_2) a 2,5 mM
- Sulfato de magnésio (MgSO_4) a 1,2 mM
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) a 1,2 mM
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 24mM
- Glicose a 11 mM
- 2 L de água destilada q.s.p.

3.18.2. Solução de EDTA 100 mM

- 0,07 g de EDTA
- 200 mL de água destilada q.s.p.
- pH 7,4

As soluções de EDTA 10 mM e 20 mM foram preparadas ao se dissolver a solução de EDTA 100 mM em PBS 1X e salina 0,9%, respectivamente.

3.18.3. PBS 10 X

- 0,51 g de Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 11,86 g de Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4)
- 17,53 g de NaCl
- 200 mL de água destilada q.s.p.
- pH 7,4

A solução de PBS 1X foi preparada ao se dissolver a solução de PBS 10X em água destilada.

3.18.4. Tampão de amostra SDS-PAGE

- Tris HCl a 0,1 M pH 6,8
- SDS a 4 %
- β -mercaptoetanol a 0,2%
- Azul de bromofenol a 0,2 %
- Glicerina a 2%
- 5 mL de água bidestilada q.s.p.

3.18.5. Gel de corrida de poliacrilamida 10 %

Para 4 géis:

- 7 mL de bis-acrilamida 30%
- 7 mL da solução Tris HCl 1,5 M pH 8,8
- 7 mL de água destilada
- 0,01 mL de tetrametiletilenodiamina (Temed)
- 0,2 mL de persulfato de amônio (PSA) a 10%

3.18.6. Gel de empacotamento de poliacrilamida 4%

Para 4 géis:

- 1 mL de bis-acrilamida 30%
- 1,875 mL da solução Tris HCl 0,5 M pH 6,8
- 4,8 mL de água destilada

- 0,01 mL de Temed
- 0,1 mL de PSA a 10%

3.18.7. Tampão de corrida 10X

- 30 g de Tris base
- 144 g de glicina
- 10 g de SDS
- 1 L de água destilada q.s.p.

3.18.8. Tampão de transferência 1 X

- 3 g de Tris base
- 14,4 g de glicina
- 200 mL de metanol
- 1 L de água destilada q.s.p.

3.18.9. Tampão TBS 10X

- 24,2 g de Tris base
- 80 g de NaCl
- 1 L de água destilada q.s.p.
- pH 7,6

A solução de TBS 1X foi preparada ao se dissolver a solução de TBS 10X em água bidestilada.

3.18.10. Tampão TBST

- 999 mL da solução TBS 1X
- 1 mL de *tween-20*

3.18.11. Solução salina balanceada de Hanks

- 0,097 g de Hank's sem fenol *red* e sem NaHCO_3
- 0,035 g de NaHCO_3
- 0,203 g de Hepes
- 100 mL de água destilada q.s.p.

3.18.12. Tampão de iodeto de propideo

- Tris HCl a 3,4mM pH 7,6
- NaCl a 10 mM
- NP-40 a 0,1%
- RNase a 700 U/L
- PI a 0,075 mM
- 40 mL de água destilada q.s.p.
- Fotossensível

3.18.13. Milloning

- 200 mL de Formaldeído (HCOH) a 4%
- 37,2 g de Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄)
- 8,4 g Hidróxido de sódio (NaOH) a 105 mM
- 1,8 L de água destilada q.s.p.

Dissolver o NaH₂PO₄ e o NaOH em água destilada e na sequência acrescentar a solução de Formaldeído.

3.18.13. AEC uso

- Fotossensível, colocar as substâncias nesta ordem:
- Primeiro colocar 9,5 mL de tampão acetato:
 - Preparo tampão acetato:
 - Solução 1: Acetato de sódio (CH₃COONa.3H₂O) a 0,1M
 - Solução 2: Ácido acético glacial a 0,575%
 - Misturar 79 mL da solução 1 com 21 mL da solução 2 pH 5,2
- Em seguida, colocar 0,5 mL de AEC estoque
 - Preparo AEC estoque:
 - 0,8% de AEC em N,N-dimetilformamida (C₃H₇NO)
- Por fim, colocar 50 µL de H₂O₂ 3%

3.18.14. Meio de montagem para imunohistoquímica

- 10 g de gelatina em pó
- 70 mL de glicerina
- 1 mL de fenol

- 60 mL de água destilada

3.19. Drogas

Carbacol, metacolina, L-NAME, SC-560, NS-398, SQ 22 536, glucagon, des-His¹-[Glu⁹] glucagon amida, LPS, nembupal, OVA, dexametasona e rolipram foram obtidos da *Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)*. Brometo de pancurônio e tiopental foram obtidos da *Cristália (São Paulo, Brasil)*. A heparina sódica foi obtida da *Roche (São Paulo, Brasil)*. A calceína AM e a IL-8 humana foram obtidas da *Thermo Fisher Scientific Inc (Rockford, EUA)*. A IL-13 humana foi obtida da *Peprtech (New Jersey, EUA)* e a IL-13 murina foi obtida da *R&D Systems (MN, EUA)*.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

3.20. Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição normal das variáveis numéricas. Após essa confirmação da normalidade dos dados, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente através da análise de variância de uma via (*one way ANOVA*) seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Glucagon impede a contração da musculatura lisa de traqueias induzida por carbacol *in vitro* através da ativação do seu receptor (GcgR)

A estimulação de traqueias isoladas de camundongos A/J com concentrações crescentes de carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M) induziu contração da musculatura lisa *in vitro* de forma concentração-dependente. O efeito máximo do carbacol foi evidenciado na concentração de 10^{-5} M (Figura 4.1A). O pré-tratamento com glucagon (0,1 e 1 μ M), 30 min antes da adição das concentrações de carbacol, foi capaz de impedir as contrações do músculo liso traqueal *in vitro*. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os efeitos das 2 concentrações de glucagon testadas, a concentração de 1 μ M apresentou melhor resposta (Figura 4.1B). Além disso, calculamos os valores de Emax e pEC50 do carbacol e observamos que as duas concentrações de glucagon reduziram os valores de Emax, porém não alteraram os valores de pEC50 do carbacol (Tabela 4.1). Diante disso, passamos a utilizar os valores de Emax do carbacol para expressar os resultados dos próximos experimentos.

Para avaliar o envolvimento do GcgR no efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*, traqueias foram previamente incubadas com um inibidor de adenilatociclase (SQ 22,536; 5 μ M) ou com um antagonista do GcgR (des-His¹-[Glu⁹]-glucagon-amida, 1 μ M) 30 min antes de serem tratadas com glucagon (1 μ M) *in vitro*. Tanto o SQ 22,536 quanto o des-His¹-[Glu⁹]-glucagon-amida inibiram o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa traqueal induzida por carbacol *in vitro* (Figura 4.2A e 4.2B, respectivamente). Inesperadamente, as traqueias que só receberam o SQ 22,536 apresentaram uma inibição da contração da musculatura lisa induzida por carbacol *in vitro* (Figura 4.2A).

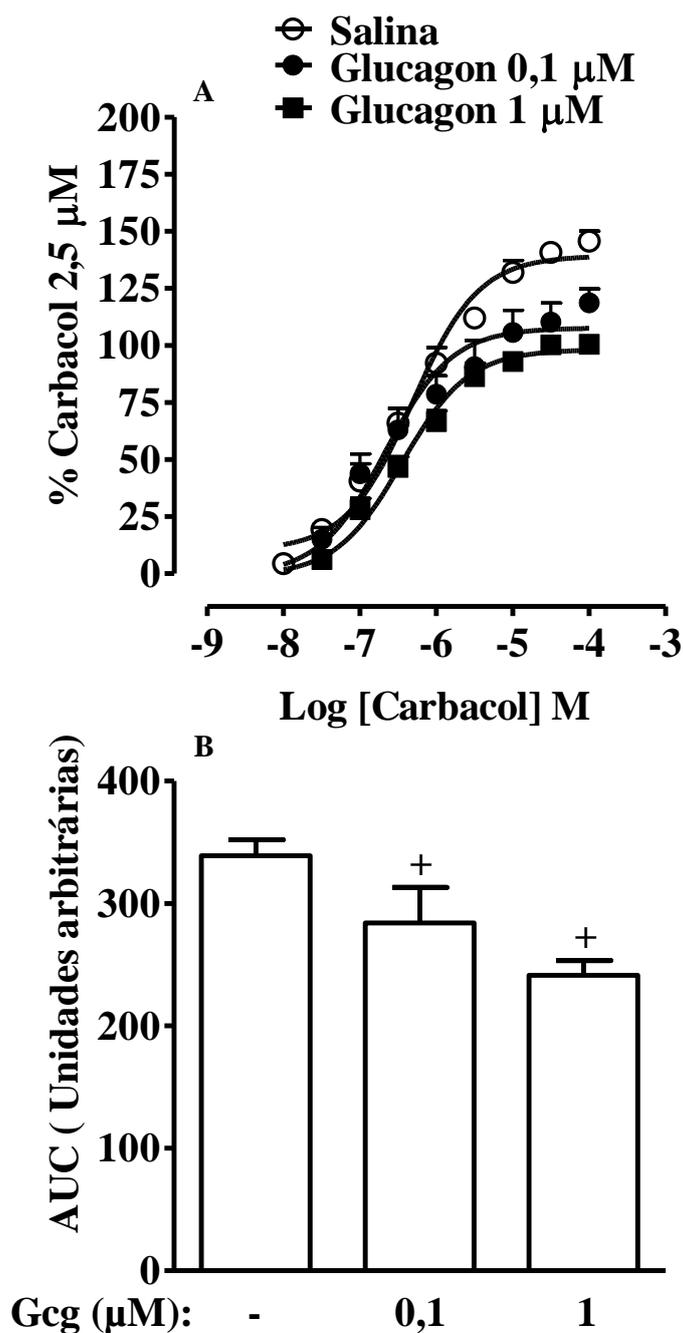


Figure 4.1. Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueias de camundongos A/J induzida por carbacol *in vitro*. (A) Efeito do glucagon sobre a contração traqueal induzida por carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M) *in vitro*. (B) A área sob a curva (AUC) foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta da contração promovida pelo carbacol. Todos os resultados representam a percentagem da resposta contrátil ao carbacol 2,5 μM e são expressos como média ± E.P.M. de 7-9 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina *in vitro*. Gcg = Glucagon.

Tabela 4.1. Glucagon inibe a resposta contrátil máxima (Emax) mas não a potência (pEC50) do carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M) em traqueais de camundongos A/J

Tratamento	Emax (% do Carbacol 2,5 μM)	pEC₅₀
Salina	139,3 \pm 3,17	6,32 \pm 0,07
Glucagon 0,1 μM	107,7 \pm 4,38⁺	6,66 \pm 0,14
Glucagon 1 μM	98,15 \pm 2,46⁺	6,45 \pm 0,07

A tabela mostra os valores de Emax e pEC50 calculados a partir das curvas de concentração-resposta do carbacol evidenciadas na Figura 4.1A. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 7-9 animais por grupo e analisados estatisticamente através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado com salina *in vitro*. Emax = Resposta contrátil máxima induzida pelo carbacol. pEC50 = Logaritmo negativo da concentração de carbacol que produz 50% do efeito máximo.

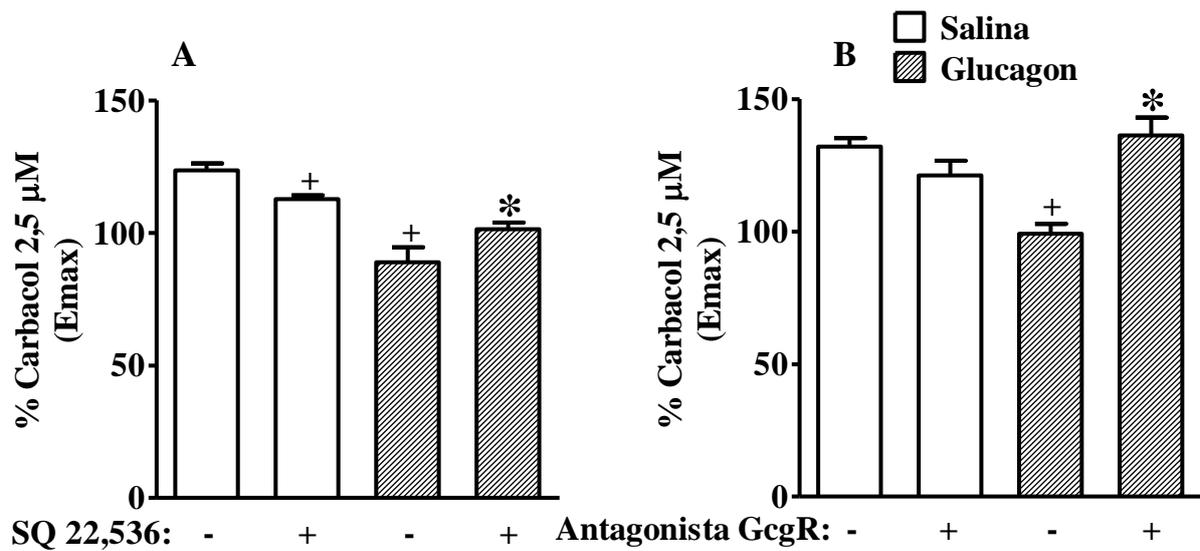


Figura 4.2. Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa de traqueias induzida por carbacol *in vitro* é dependente da ativação do GcgR. Inibidor de adenilato ciclase (SQ 22,536; 5 μM) (A) e antagonista do GcgR (des-His¹-[Glu⁹]-glucagon-amida; 1μM) (B) inibem o efeito anti-espasmódico do glucagon (1μM) sobre a contração traqueal promovida pelo carbacol (10⁻⁸- 10⁻⁴ M) *in vitro*. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com salina *in vitro*. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com glucagon *in vitro*.

4.2. Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa induzida por carbacol *in vitro* é dependente da ativação do epitélio e da liberação de NO e de produtos da ativação de COX-1

Em seguida, fomos avaliar o papel do epitélio no efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*. Para isso, removemos mecanicamente o epitélio de algumas traqueias e, incubamos essas traqueias com glucagon (1 μ M) ou salina *in vitro*. O glucagon foi capaz de desempenhar ação anti-espasmódica sobre a contração da musculatura lisa induzida por carbacol *in vitro* em traqueias com o epitélio intacto. Entretanto, o tratamento com glucagon não impediu a contração induzida por carbacol *in vitro* em traqueias desepitelizadas. Não foi observada diferença entre a contração do músculo liso promovida pelo carbacol em traqueias tratadas com salina *in vitro* submetidas à remoção do epitélio em comparação as traqueias também incubadas com salina *in vitro*, mas que não sofreram esse procedimento de desepitelização (Figura 4.3A).

Como foi observado que o efeito anti-espasmódico do glucagon só ocorre na presença do epitélio, fomos investigar quais fatores liberados pelo epitélio poderiam estar envolvidos nesse efeito do glucagon. Para isso, algumas traqueias foram pré-incubadas com inibidores de: NOS (L-NAME; 100 μ M), COX-1 (SC-560; 1 μ M) ou COX-2 (NS-398; 0,03 μ M), 30 min antes de serem tratadas com glucagon (1 μ M) ou salina *in vitro*. Como ilustrado na Figura 4.3, tanto o L-NAME quanto o SC-560 inibiram a ação do glucagon sobre a contração traqueal promovida pelo carbacol *in vitro*. Porém, o NS-398 não foi capaz de bloquear o efeito do glucagon *in vitro*. Traqueias que foram incubadas somente com DMSO 0,1%, veículo do SC-560 e do NS-398, apresentaram resposta contrátil ao carbacol *in vitro* semelhante às traqueias incubadas somente com salina *in vitro* (dados não mostrados). Por isso, representamos nos gráficos apenas os grupos que foram incubados com DMSO 0,1% *in vitro* (Figuras 4.3C e 4.3D). As traqueias que receberam somente L-NAME, SC-560 ou NS-398 *in vitro* apresentaram contração da musculatura lisa semelhante aos seus respectivos grupos controle (Figuras 4.3B, 4,3C e 4.3D).

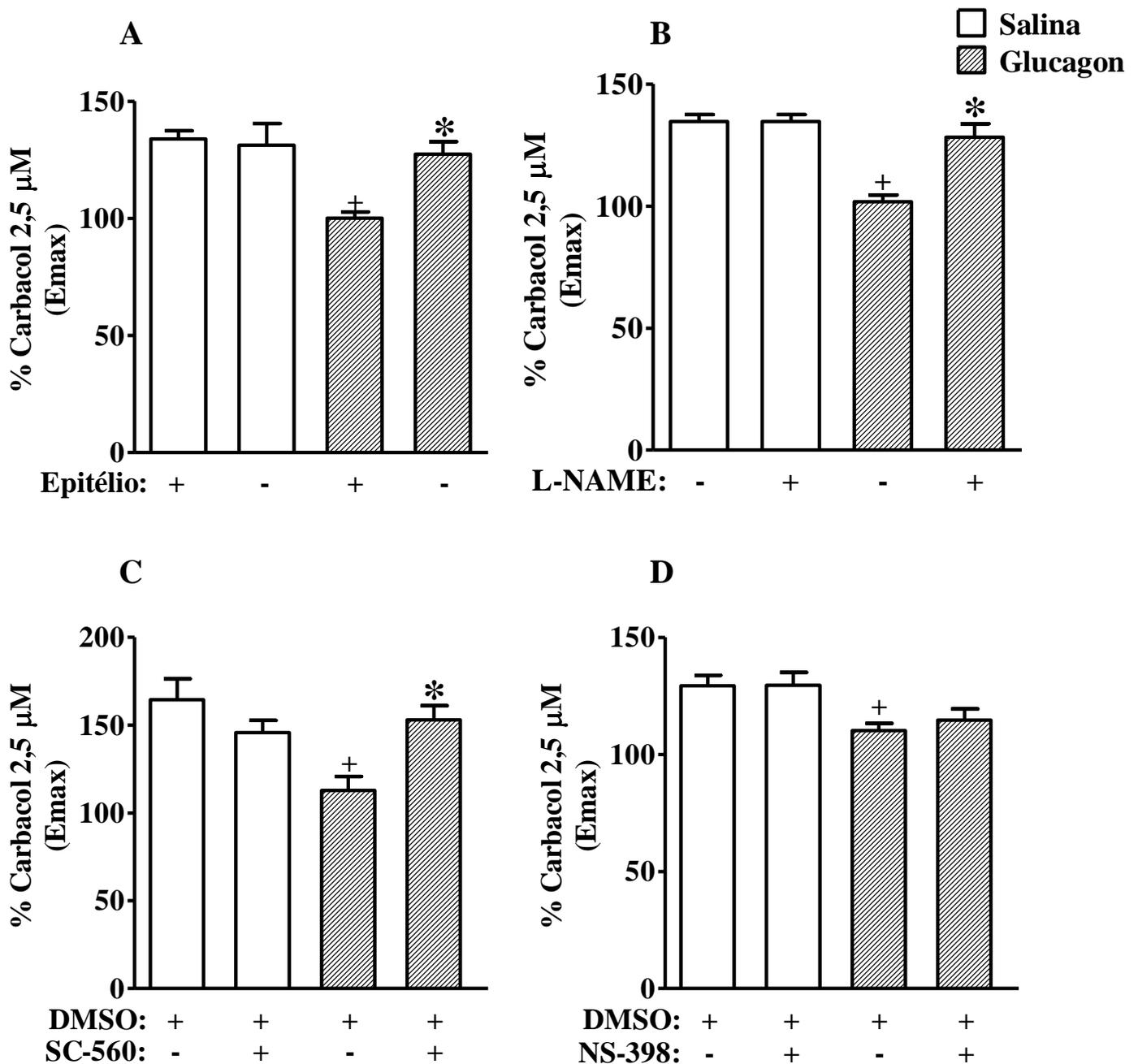


Figura 4.3. Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração traqueal promovida pelo carbacol *in vitro* depende da ativação do epitélio e necessita dos metabólitos de NOS e COX-1, mas não dos produtos de COX-2. Remoção do epitélio (A) e inibidores de NOS (L-NAME; 100 μ M) (B) e COX-1 (SC-560; 1 μ M) (C) abolem o efeito anti-espasmódico do glucagon (1 μ M) sobre a contração do músculo liso de traqueias induzida pelo carbacol (10^{-8} – 10^{-4} M) *in vitro*. O inibidor de COX-2 (NS-398; 0,03 μ M) (D) não exerce nenhuma ação sobre o efeito inibitório do glucagon na contração traqueal induzida por carbacol (10^{-8} - 10^{-4} M) *in vitro*. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 4-8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com salina *in vitro*. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com glucagon *in vitro*. DMSO (0,1 %).

4.3. Glucagon impede a contração do músculo liso das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo*

Para investigar se o glucagon também era capaz de prevenir a contração do músculo liso das vias aéreas promovida por estímulo colinérgico *in vivo*, camundongos A/J machos foram tratados com salina estéril (0,9%, i.n.) ou glucagon (0,1, 1 ou 10 µg/Kg, i.n.) e 3 h após o tratamento, foram inseridos num sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo que permitiu a avaliação da função pulmonar através da análise dos parâmetros de RL e Cdyn.

Nesse pletismógrafo invasivo, foi observado que a metacolina induziu aumento na RL e redução na Cdyn de camundongos A/J de forma concentração-dependente (3, 9 e 27 mg/mL) (Figuras 4.4A e 4.4C, respectivamente). O tratamento i.n. com glucagon apenas na dose de 1 µg/Kg foi capaz de impedir esse aumento na RL (Figuras 4.4A e 4.4B). Apenas as doses de 0,1 e 1 µg/Kg de glucagon administradas i.n. foram capazes de impedir a redução na Cdyn induzida pela metacolina (Figuras 4.4C e 4.4D). Além disso, a dose de 1 µg/kg de glucagon aumentou de forma significativa os valores basais da Cdyn (Figura 4.4C).

4.4. O efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração do músculo liso das vias aéreas induzida por metacolina *in vivo* depende da ativação de CREB e da produção de NO e PGE₂

Diante dos resultados descritos acima em que observamos que o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa da traqueia induzida por carbacol *in vitro* foi dependente da ativação de NOS e COX-1, fomos investigar se a inibição dessas enzimas poderia interferir na ação do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas *in vivo*. Para isso, L-NAME (20 mg/Kg,) ou SC-560 (5 mg/Kg,) foram administrados i.p. 30 min antes do tratamento com glucagon (1 µg/Kg, i.n.) e 3 h após o glucagon, os animais foram inseridos no sistema de pletismografia barométrica do corpo inteiro invasivo.

Como observado anteriormente, a metacolina induziu aumento da RL dos camundongos A/J de forma concentração-dependente (3, 9 e 27 mg/mL), como demonstrado pelos grupos que receberam apenas salina (0,9%, i.n.) (Figuras 4.5.A e 4.6A). O mesmo foi observado para os animais tratados apenas com L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) ou com SC-560 (5 mg/Kg, i.p.) (Figuras 4.5A e 4.6A, respectivamente). O tratamento com glucagon (1 µg/Kg, i.n.) foi capaz de impedir esse aumento da RL (Figuras 4.5A, 4.5B, 4.6A e 4.6B). Tanto a administração de L-NAME (Figuras 4.5A e 4.5B), quanto à de SC-560 (Figuras 4.6A e 4.6B)

inibiram esse efeito do glucagon sobre a RL. Além de atuar sobre a RL, a metacolina também promoveu uma redução na C_{dyn} de forma concentração-dependente nos animais em que foi administrada apenas salina (0,9% i.n.) como observado nas Figuras 4.5C e 4.6C. Como no parâmetro da RL, não houve diferença estatística nas respostas à metacolina no parâmetro da C_{dyn} entre os animais tratados apenas com L-NAME (Figuras 4.5C e 4.5D) ou SC-560 (Figuras 4.6C e 4.6D) em relação aos seus respectivos controles. O tratamento com glucagon impediu a redução da C_{dyn} promovida pela metacolina (Figuras 4.5C e 4.6C) e, esse efeito do glucagon na C_{dyn}, foi bloqueado pela administração prévia com L-NAME (Figuras 4.5C e 4.5D) ou SC-560 (Figuras 4.6C e 4.6D).

O efeito do glucagon após 5, 10, 15, 30, 60, 120 e 180 min da instilação com glucagon (1 µg/Kg) sobre a expressão e ativação de CREB, NOS-3 e COX-1 em pulmões de camundongos A/J foi avaliado por *Western blot* e pela quantificação de PGE₂ por *EIA*.

Glucagon promoveu a fosforilação de CREB 15 a 30 min após a sua administração (Figura 4.7A), enquanto a fosforilação de NOS-3 se iniciou aos 30 min e permaneceu até 180 min após a instilação do glucagon (Figura 4.7B). A partir de 30 min da administração de glucagon foi observado um aumento da produção de PGE₂ que permaneceu elevada até o tempo de 180 min (Figura 4.7D). No entanto, o glucagon não alterou a expressão de COX-1 (Figura 4.7C).

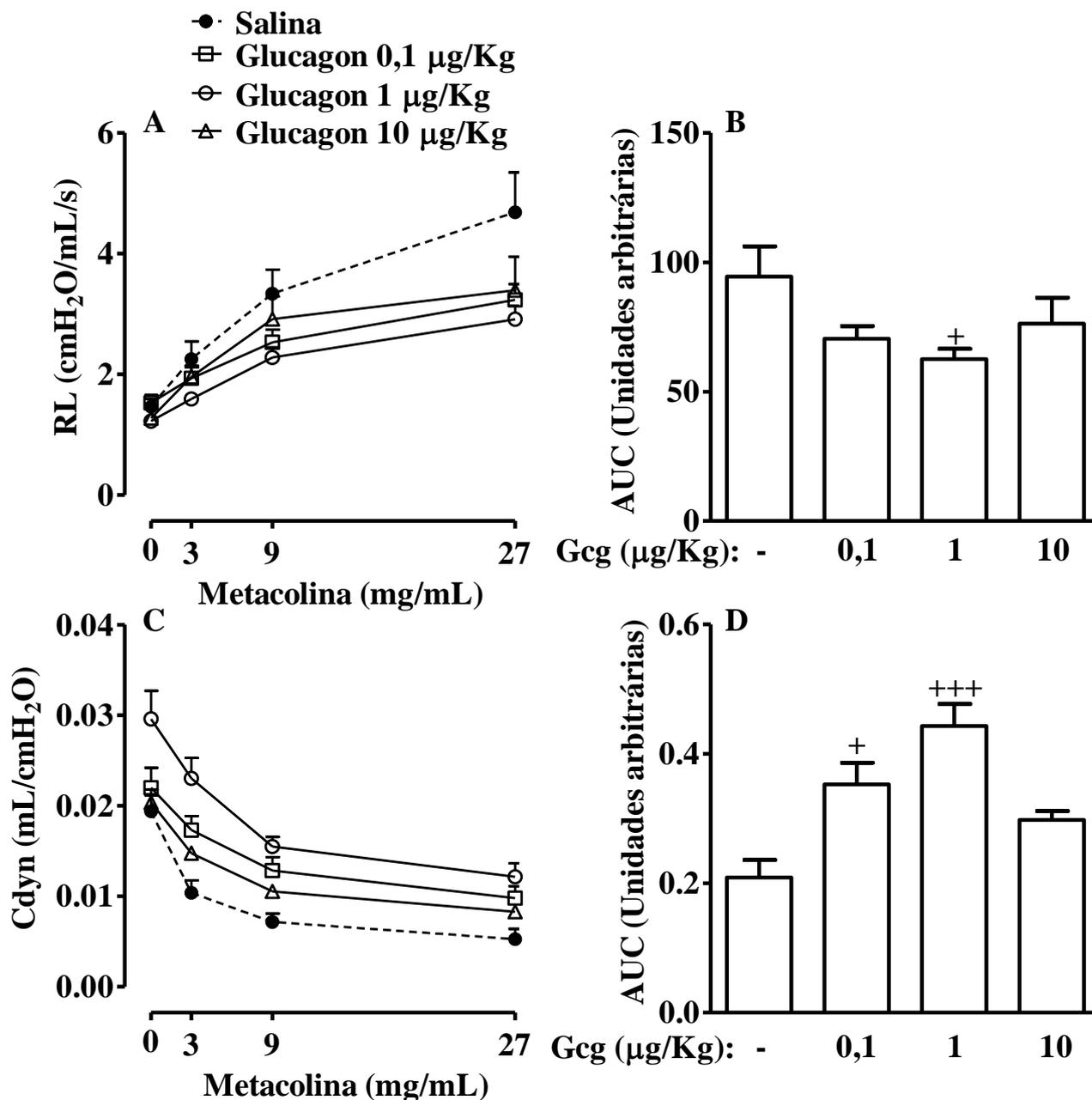


Figura 4.4. Administração de glucagon impede a contração da musculatura lisa das vias aéreas promovida pela metacolina *in vivo*. Curvas dose-resposta do efeito anti-espasmódico do glucagon (0,1, 1 e 10 µg/Kg, i.n.) sobre o aumento da RL (A) e redução da Cdyn (C) induzidos pela metacolina (0 - 27 mg/mL) *in vivo*. AUC foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta da RL (B) e Cdyn (D) após exposição a metacolina (0 - 27 mg/mL). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com salina (0,9%, i.n.). +++ $P < 0,001$ em comparação ao grupo tratado somente com salina (0,9%, i.n.). Gcg = Glucagon.

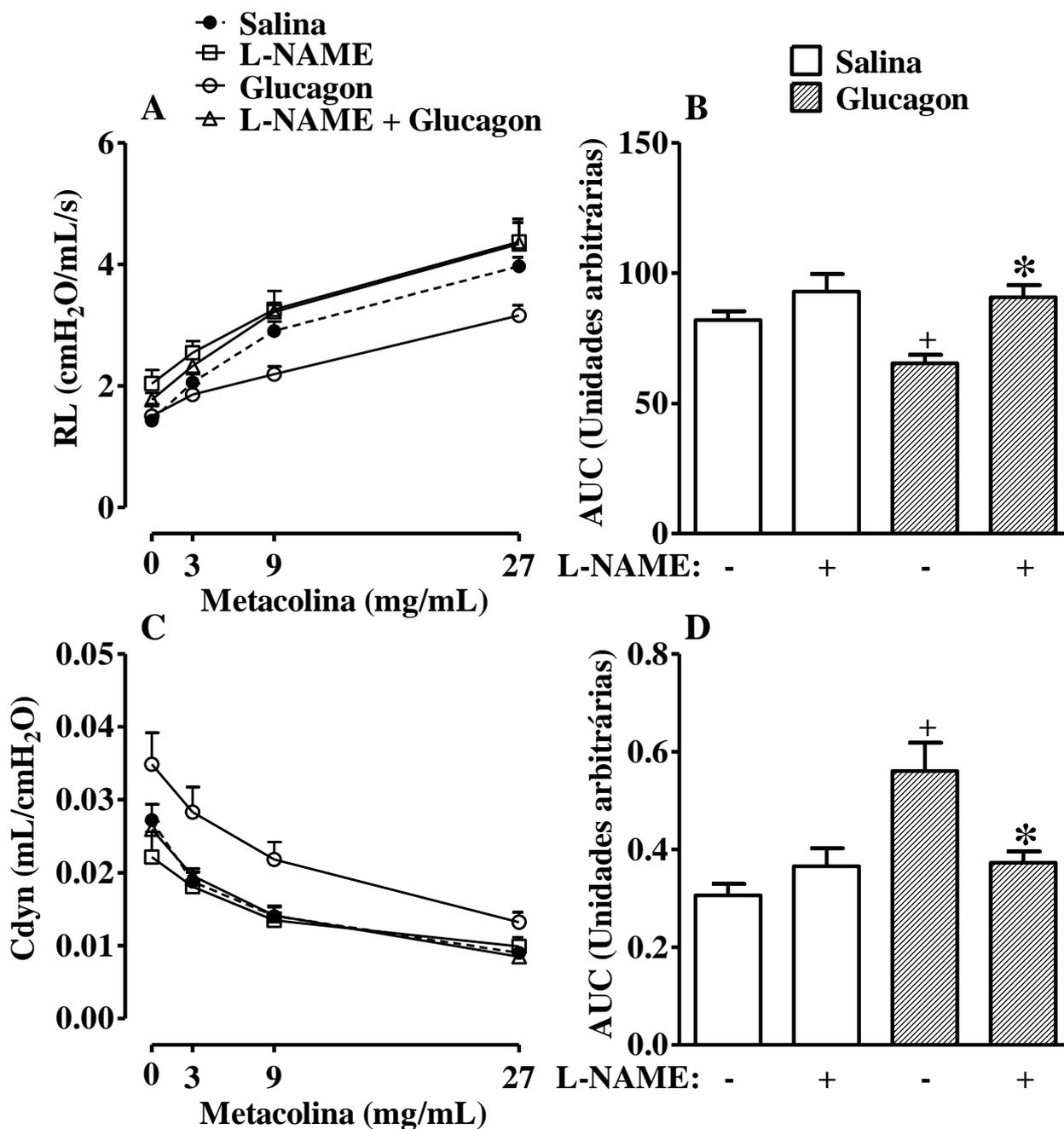


Figura 4.5. Efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a redução da função respiratória induzida pela metacolina *in vivo* depende da produção de NO. L-NAME (20 mg/Kg, i.p.) reverte o efeito anti-espasmódico do glucagon (1 µg/Kg, i.n.) sobre o aumento da RL (A) e redução da Cdyn (C) induzidos pela metacolina (0 - 27 mg/mL) *in vivo*. AUC foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta da RL (B) e Cdyn (D) após exposição à metacolina (0 - 27 mg/mL). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 6-7 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com salina (0,9%, i.n.). * $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com glucagon *in vivo*.

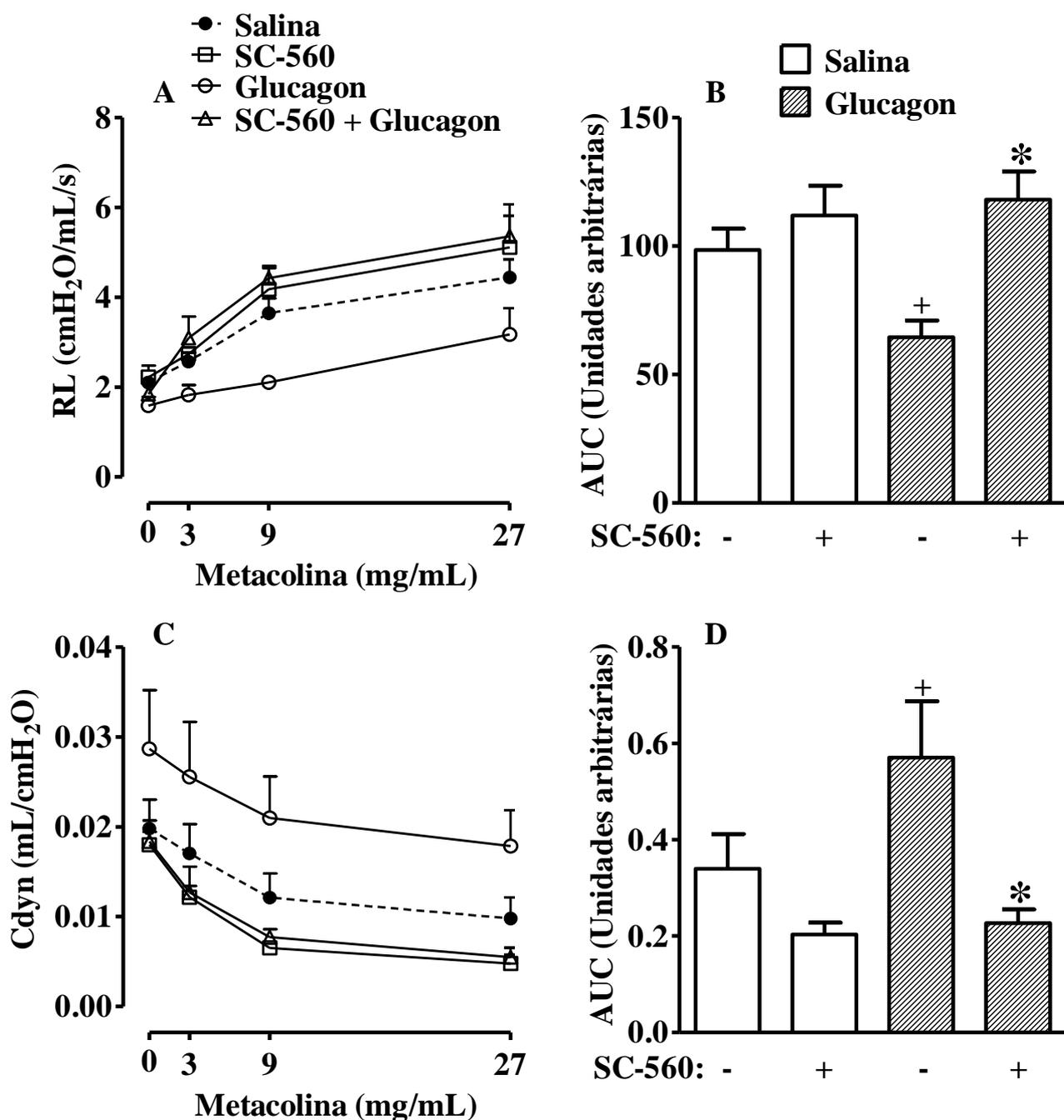


Figura 4.6. Produtos da ativação de COX-1 estão envolvidos no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a redução da função respiratória induzida pela metacolina *in vivo*. SC-560 (5 mg/Kg, i.p.) abole o efeito anti-espasmódico do glucagon (1 µg/kg, i.n.) sobre o aumento da RL (A) e redução da Cdyn (C) induzidos pela metacolina (0 - 27 mg/mL) *in vivo*. AUC foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta da RL (B) e Cdyn (D) após exposição a metacolina (0 - 27 mg/mL). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com salina (0,9%, i.n.). * $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com glucagon *in vivo*.

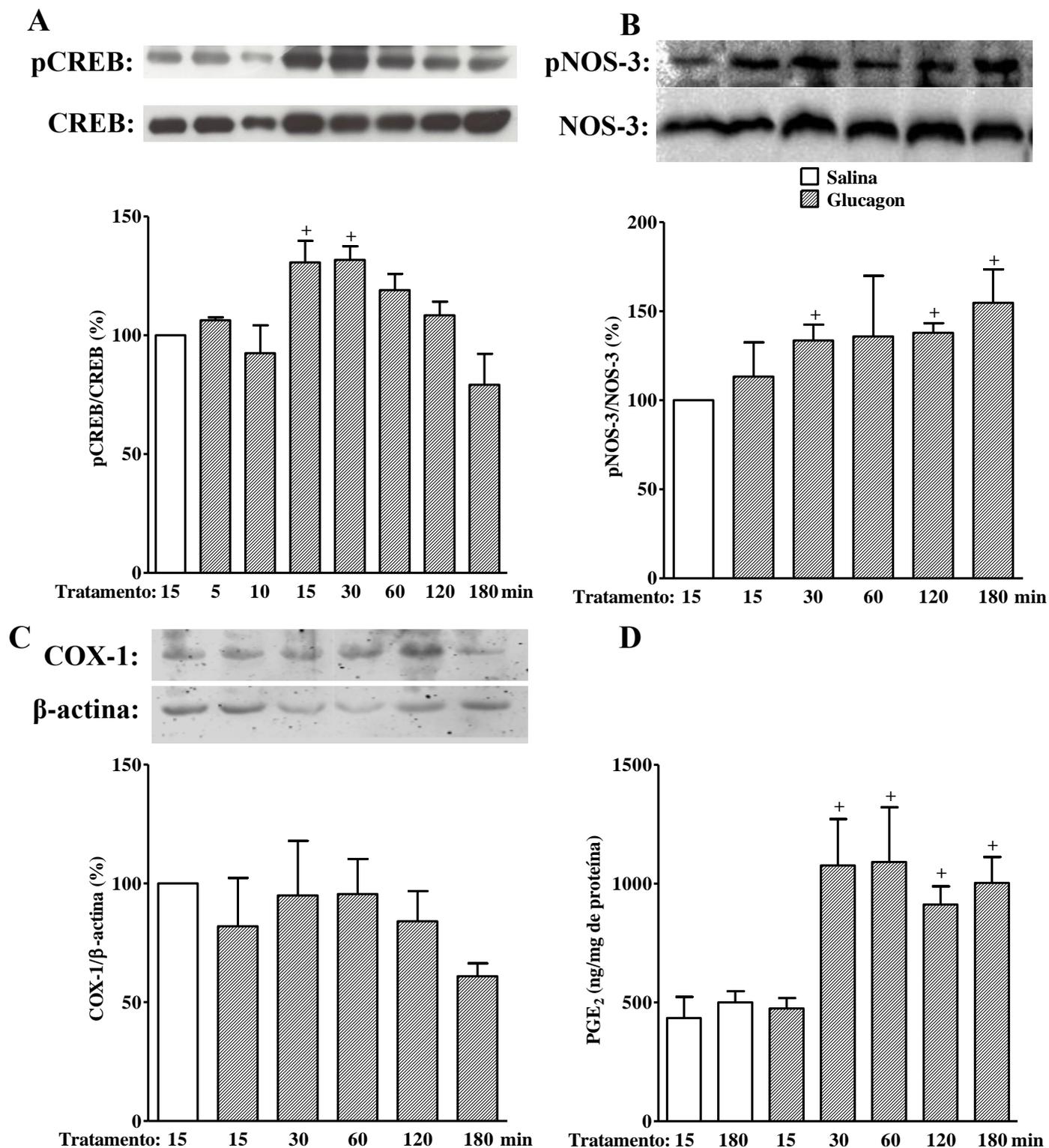


Figura 4.7. Glucagon aumenta a atividade de CREB, NOS-3 e COX-1 em pulmões de camundongos A/J. Amostras representativas da expressão de CREB-fosforilado (pCREB) (A), NOS-3 fosforilada (pNOS-3) (B) e COX-1 (C) nos pulmões de camundongos instilados com glucagon (1 μ g/Kg). A expressão de pCREB, pNOS-3 e COX-1 foi determinada por *Western blot*. Os dados foram normalizados pela expressão de CREB, NOS-3 e β -actina, respectivamente. (D) A quantificação dos níveis de PGE₂ nos pulmões de camundongos tratados com glucagon (1 μ g/Kg, i.n.) foi realizada por *EIA*. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da *ANOVA* de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo tratado somente com salina (0,9%, i.n.).

4.5. Glucagon impede inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas induzida por LPS

Tendo em vista que o glucagon apresenta ação anti-espasmódica sobre a contração da célula muscular lisa das vias aéreas *in vitro* e *in vivo*, fomos investigar se o efeito anti-espasmódico do glucagon seria mantido num contexto de inflamação e, se esse hormônio também poderia exercer ação anti-inflamatória *in vivo*.

Num primeiro modelo de inflamação pulmonar, os animais foram tratados com salina (0,9%, i.n.) ou glucagon (1 µg/Kg, i.n.) e 1 h após foram instilados com salina (0,9%) ou LPS (25 µg/25 µL). A estimulação com LPS promoveu um aumento no número de leucócitos totais no BAL, que foi acompanhado por uma elevação no número de neutrófilos e células mononucleares (Figura 4.8A) 18 h após a instilação. Em paralelo a esse aumento no recrutamento de leucócitos, a instilação com LPS promoveu uma elevação nos níveis de TNF- α no BAL (Figura 4.8B). Todas estas alterações inflamatórias, exceto a elevação na contagem de células mononucleares, foram claramente sensíveis ao glucagon administrado 1 h antes do LPS (Figuras 4.8A e 4.8B).

No sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo, como já descrito anteriormente, a metacolina promoveu aumento da RL e redução da Cdyn de forma concentração-dependente (3, 9 e 27 mg/mL). Esse aumento da RL e diminuição da Cdyn ocorreram de forma mais intensa no grupo de camundongos submetidos a estimulação com LPS do que no grupo que apenas recebeu salina (0,9%, i.n.), o que caracterizou um fenômeno de hiper-reatividade das vias aéreas nesses animais instilados com LPS. O tratamento com glucagon (1 µg/Kg, i.n.) impediu a hiper-reatividade das vias aéreas induzida pelo LPS tanto no parâmetro de RL (Figuras 4.8C e 4.8D) quanto no de Cdyn (Figuras 4.8E e 4.8F).

4.6. PMNs isolados de sangue humano expressam GcgR e são inibidos pelo glucagon de migrarem em resposta ao estímulo com IL-8 *in vitro*

Como observamos que o tratamento com glucagon foi capaz de impedir a inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas induzida pelo LPS num modelo de LPA/SDRA, fomos buscar quais seriam as possíveis células-alvo para esse efeito do glucagon. Escolhemos os neutrófilos como uma possível célula-alvo devido a importância dessas células na fisiopatologia da LPA/SDRA. Porém, nossa ferramenta para trabalhar com neutrófilos era utilizar células PMNs obtidas de sangue humano. Após o protocolo de isolamento de PMNs a partir de sangue humano obtivemos uma população constituída aproximadamente por 90% de

PMNs. A partir dessa população, observamos que cerca de 50% dos PMNs expressam o GcgR (Figura 4.9A).

Em seguida, fomos avaliar o efeito do glucagon (0,03 – 3 μ M) sobre a quimiotaxia desses PMNs induzida por IL-8 (100 ng/mL) humana *in vitro*. A estimulação com IL-8 promoveu um aumento na migração dos PMNs e, o tratamento com rolipram (5 μ M) *in vitro* preveniu essa migração. Todas as concentrações de glucagon testadas foram capazes de impedir a quimiotaxia de PMNs estimulada por IL-8 *in vitro* (Figura 4.9B). Por fim, verificamos que não houve alteração na viabilidade dos PMNs após 3 e 24 h de tratamento com glucagon *in vitro* (Figura 4.9C).

4.7. Glucagon não impede a secreção de IL-8 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com LPS *in vitro*

Outro tipo celular que é foco do nosso estudo são as células epiteliais das vias aéreas visto que essas células são uma das principais produtoras da quimiotaxia IL-8 nas vias aéreas. Nessa etapa, fomos investigar o efeito do glucagon sobre a secreção de IL-8 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com LPS *in vitro*. O LPS (1 μ g/mL) induziu secreção de IL-8 pelas células A549 e a dexametasona (1 μ M) foi capaz de impedir essa liberação de IL-8 pelas células A549. Nenhuma das concentrações de glucagon utilizadas (0,003 – 1 μ M) foi capaz de impedir a secreção de IL-8 pelas células A549 estimuladas com LPS *in vitro* (Figura 4.10).

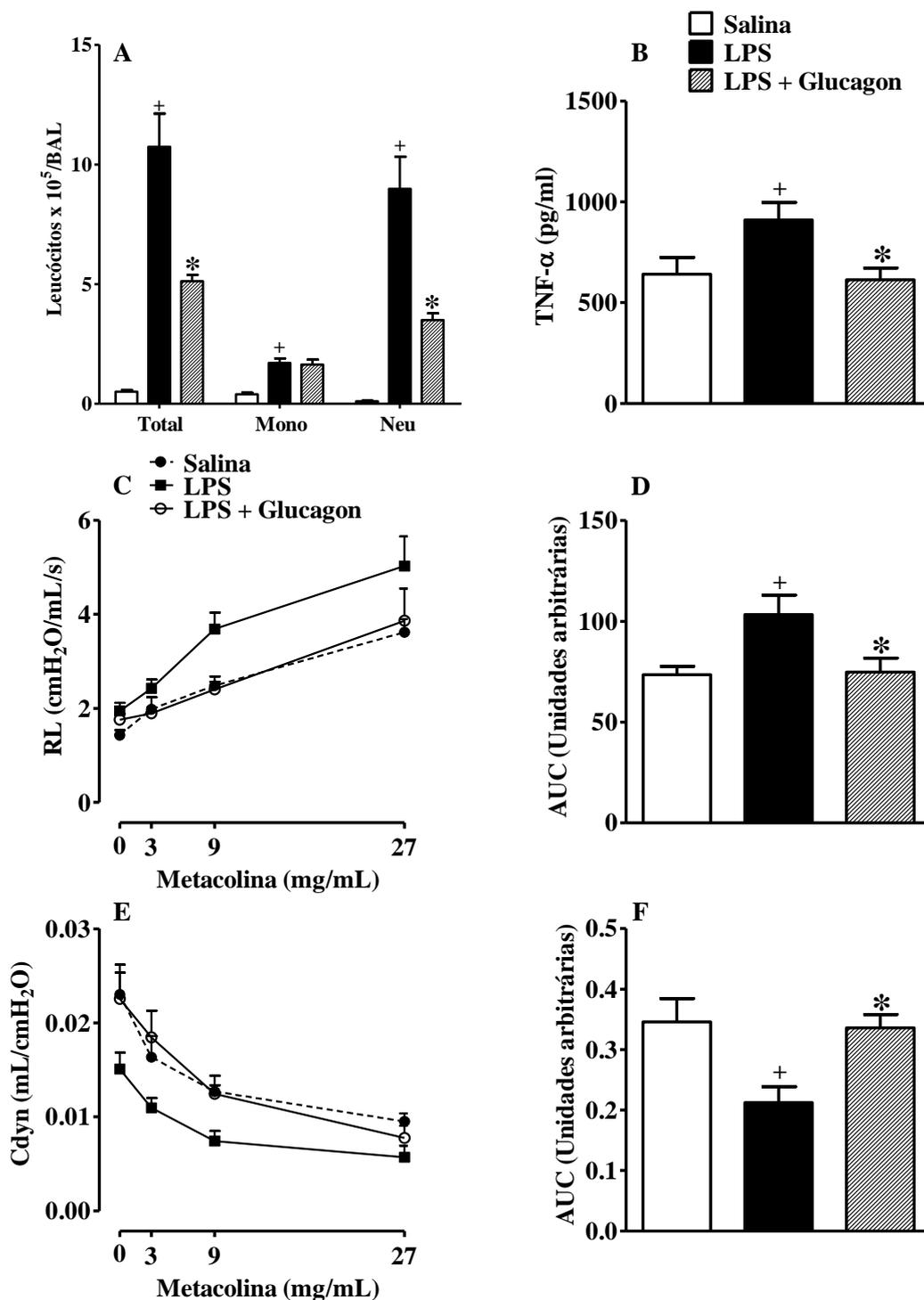


Figura 4.8. Inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas induzidas pelo LPS são sensíveis ao tratamento com glucagon. Glucagon (1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.n.) impede o acúmulo de leucócitos (contagem total e diferencial) (A) e o aumento dos níveis de TNF- α (B) no BAL, 18 h após a estimulação i.n. com LPS (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) ou salina (0,9%). Análise do efeito anti-espasmódico do glucagon (1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, i.n.) sobre o aumento de RL (C) e redução da Cdyn (E) induzidos pela metacolina (0 - 27 mg/mL) em camundongos A/J estimulados com LPS ou salina. AUC foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta da RL (D) e Cdyn (F) após exposição a metacolina (0 - 27 mg/mL). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 5-7 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. $+P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). $* P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com LPS e tratado somente com salina. Mono = Mononuclear. Neu = Neutrófilo.

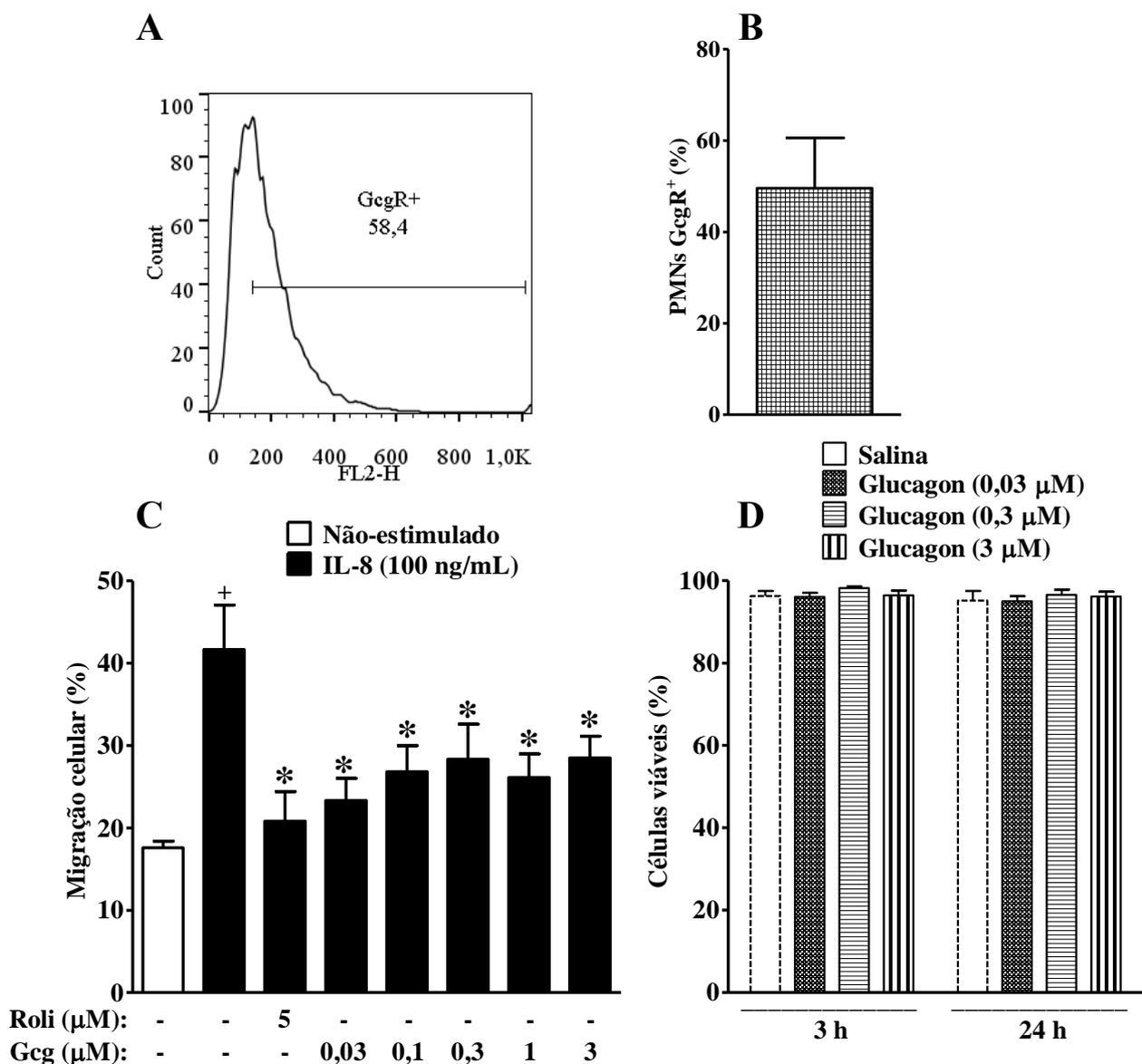


Figura 4.9. GcgR é expresso em PMNs isolados de sangue humano e o glucagon é capaz de impedir a migração desses PMNs induzida por IL-8 *in vitro* sem interferir na viabilidade dessas células. Histograma representativo da percentagem de PMNs isolados de sangue humano que expressam GcgR (A). Percentual de PMNs isolados de amostras de sangue que expressam o GcgR (B). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 3 doadores saudáveis. A expressão do GcgR foi determinada por citometria de fluxo. Efeito do glucagon sobre a quimiotaxia de PMNs induzida por IL-8 *in vitro* (C). Os PMNs foram tratados com rolipram (5 μ M) ou glucagon (0,03 – 3 μ M) *in vitro* durante 1 h. A percentagem de células que migraram após estimulação com IL-8 (100 ng/mL) foi obtida comparando o número total de PMNs presentes no compartimento inferior da placa de quimiotaxia após 2 h de estimulação e o número total de células inseridas no compartimento superior da placa no início do experimento. O grupo não-estimulado representa a difusão espontânea das células a partir da parte superior para a parte inferior da placa de quimiotaxia. Efeito do tratamento com glucagon sobre a viabilidade de PMNs (D). A viabilidade dos PMNs foi avaliada 3 e 24 h após o tratamento com glucagon (0,03 – 3 μ M) *in vitro* através da contagem de células coradas com azul de tripan 0,2 %. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 4-6 doadores saudáveis por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado com IL-8 e tratado somente com salina *in vitro*. Roli = Rolipram. Gcg = Glucagon.

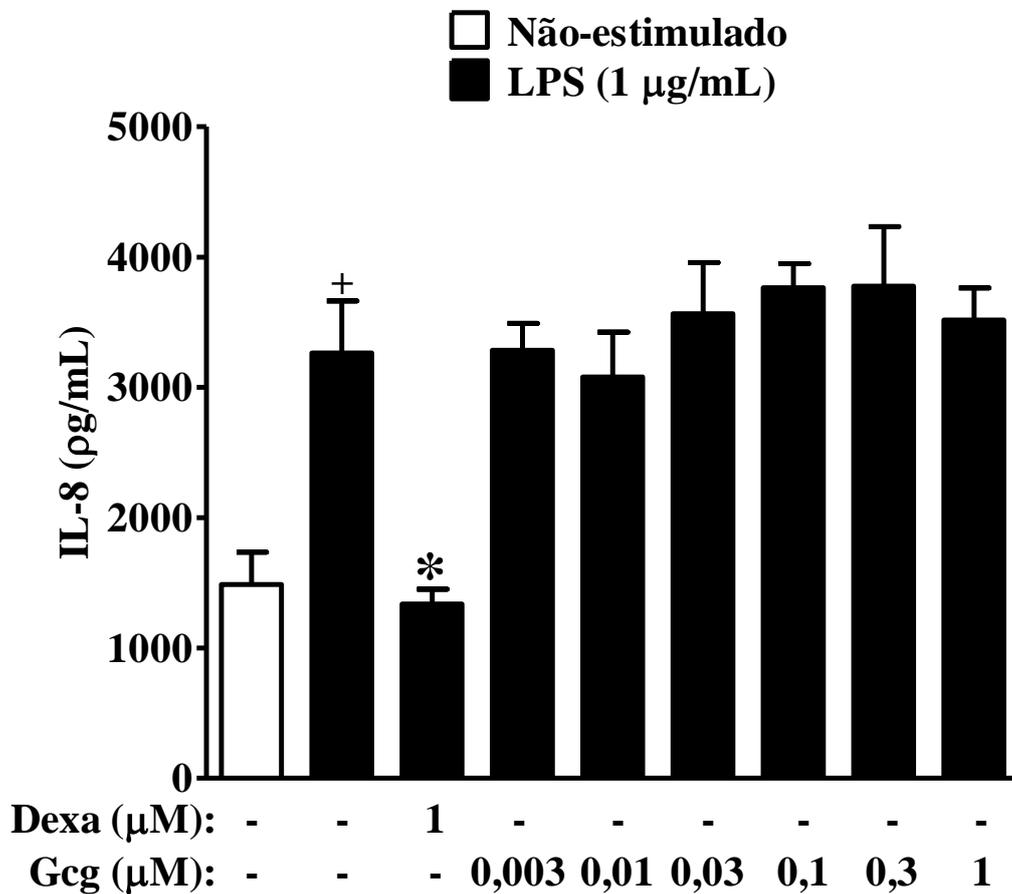


Figura 4.10. Glucagon não impede a secreção de IL-8 induzida pelo LPS em células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 *in vitro*. Efeito do glucagon (0,003 – 1 µM) sobre a produção de IL-8 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com LPS (1 µg/mL) *in vitro*. A quantificação dos níveis de IL-8 no sobrenadante dessas células foi determinada através de ELISA 24 h após a exposição ao estímulo com LPS. O tratamento com dexametasona (1 µM) ou glucagon (0,003-1 µM) foi realizado 30 min antes da estimulação com LPS *in vitro*. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4 poços por grupo de um mesmo cultivo celular. Gráfico representativo de 2 experimentos com resultados similares. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. † $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado com LPS e tratado somente com salina *in vitro*. Dexa = Dexametasona. Gcg = Glucagon.

4.8. Animais asmáticos apresentam aumento na expressão do GcgR nos pulmões, no BAL e no linfonodo mediastinal

O modelo murino de asma aguda induzida por 1 desafio i.n. ao dia com OVA, durante 2 dias, foi o outro modelo de inflamação pulmonar utilizado para investigar se o glucagon seria capaz de manter seu efeito anti-espasmódico num contexto de inflamação e se apresentaria efeito anti-inflamatório *in vivo*.

Pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) apresentaram um aumento na expressão do GcgR em comparação aos pulmões de camundongos A/J instilados apenas com salina estéril (0,9%, i.n.) (Figura 4.11). Além disso, observamos um aumento no número de células que expressam o GcgR tanto no BAL quanto no linfonodo mediastinal de animais desafiados com OVA quando comparamos com os animais instilados apenas com salina (Figura 4.12).

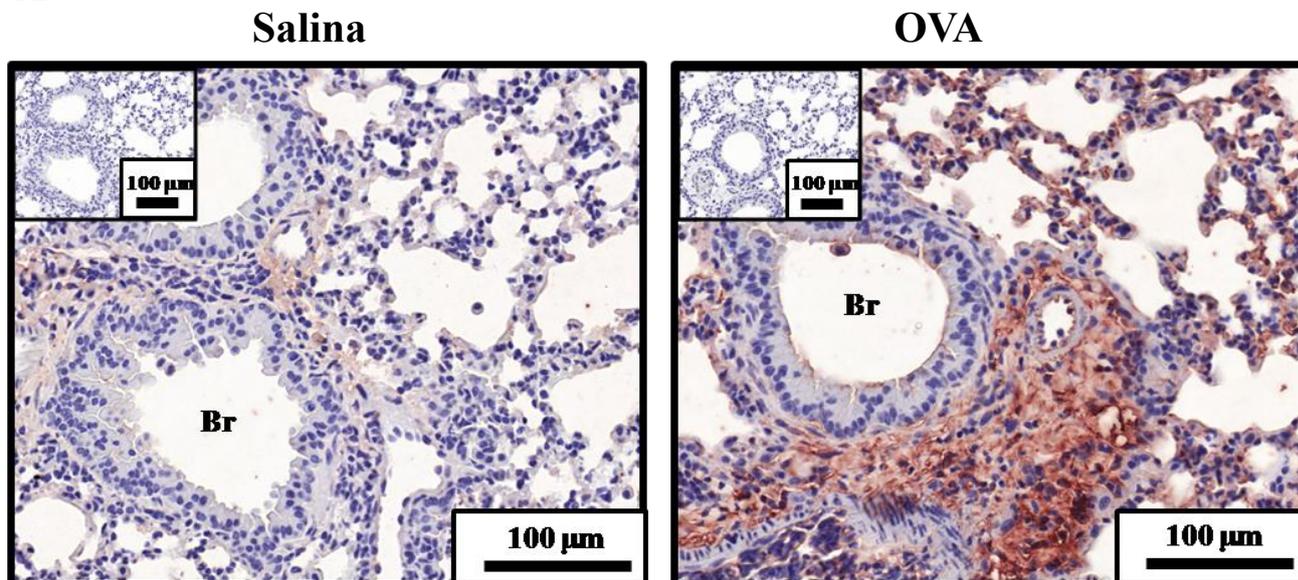
4.9. Tratamento com glucagon impede inflamação das vias aéreas e do tecido pulmonar no modelo murino de asma aguda induzida por OVA

Vinte e quatro horas após o último desafio foi observado que a estimulação com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) induziu uma elevação no número de leucócitos totais no BAL assim como no número de eosinófilos e células mononucleares em comparação a instilação com salina estéril (0,9%, i.n.) (Figura 4.13). O tratamento com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.), 1 h antes do desafio com OVA, foi capaz de impedir as alterações no número de leucócitos totais e eosinófilos, porém não interferiu no número de células mononucleares (Figura 4.13).

Em seguida, nós utilizamos o ensaio da EPO para quantificar indiretamente a presença de eosinófilos no tecido pulmonar. Nos camundongos desafiados com OVA ocorreu um aumento da atividade da EPO no extrato pulmonar em comparação aos animais instilados com salina estéril. Todas as doses do tratamento com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n) impediram essa elevação na atividade da EPO (Figura 4.14A). Nós também realizamos análises histológicas dos pulmões para a quantificação de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares nas regiões peribronquiolares. O grupo de animais desafiados com OVA apresentou um acúmulo de eosinófilos e células mononucleares, mas não de neutrófilos nas regiões peribronquiolares quando comparado ao grupo instilado com salina estéril (Figuras 4.14B, 4.14C e 4.14D, respectivamente). Ambas as doses do glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n) impediram apenas a infiltração dos eosinófilos nas regiões peribronquiolares (Figuras 4.14B, 4.14C e 4.14D).

Por fim, nós quantificamos os níveis de Eot-1, Eot-2 e IL-4 nos pulmões através da técnica de ELISA e, observamos que o desafio com OVA induziu um aumento nos níveis dessas citocinas e quimiocinas em relação a instilação somente com salina estéril. A administração i.n. com glucagon (10 e 100 µg/Kg) impediu essa elevação nos níveis da Eot-1, Eot-2 e IL-4 nos pulmões dos animais desafiados com OVA (Figura 4.15).

A



B

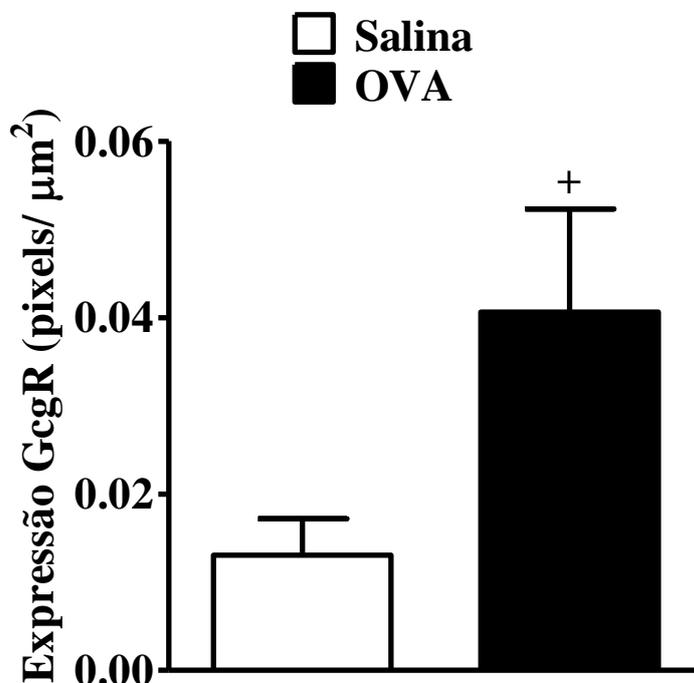


Figura 4.11. Animais asmáticos apresentam aumento na expressão do GcgR nos pulmões. Fotomicrografias representativas dos bronquíolos e região peribronquiolares dos pulmões de camundongos A/J instilados com salina estéril ou OVA (A). Os animais foram desafiados i.n. com OVA (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$) ou salina estéril (0,9 %) ou uma vez ao dia durante 2 dias. Os pulmões foram retirados para as análises 24 h após o último desafio. A expressão do GcgR foi avaliada através da técnica de imunohistoquímica, que teve como controle negativo a omissão do anticorpo primário (figura inserida). Determinação da razão entre o número de pixels correspondentes a marcação positiva para o GcgR pela área do campo capturado (B). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 4-5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.).

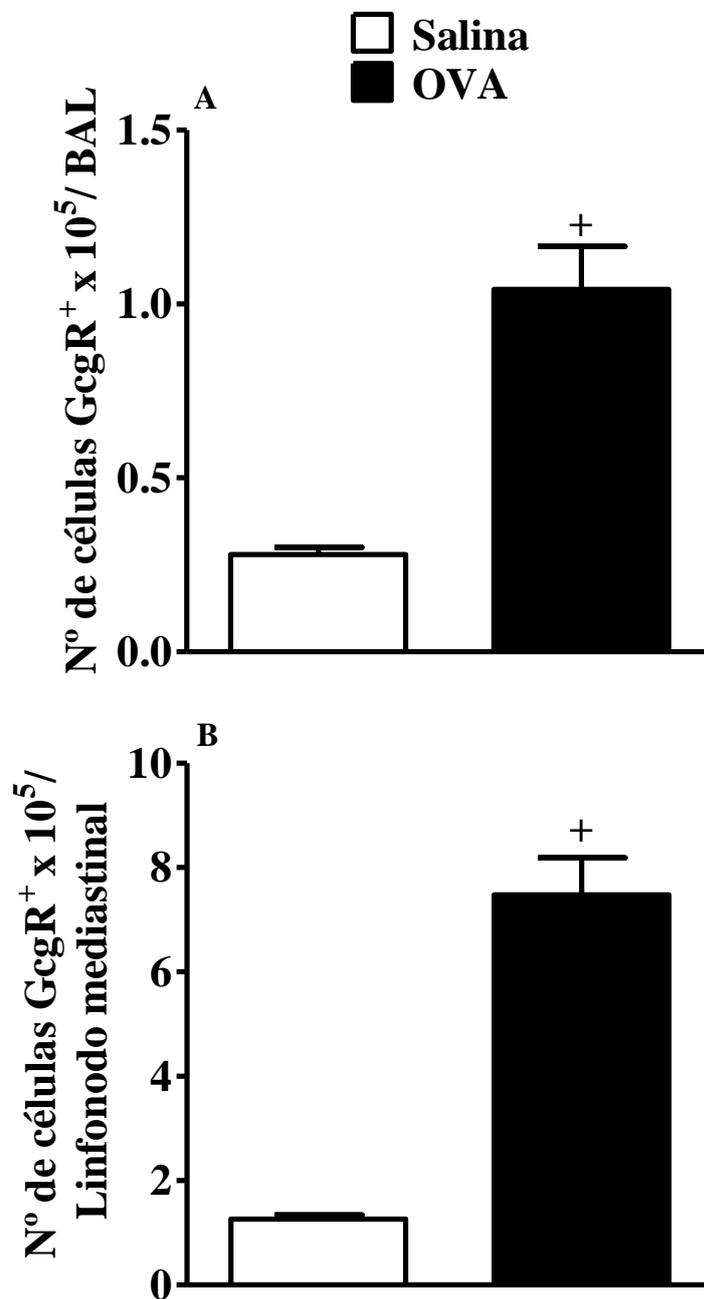


Figura 4.12. Animais asmáticos apresentam aumento no número de células que expressam o GcgR no BAL e no linfonodo mediastinal. Número de células que expressam o GcgR no BAL (A) e no linfonodo mediastinal (B) de animais desafiados i.n. com OVA ou salina estéril. Os animais foram desafiados i.n. com OVA (25 µg/25 µL) ou salina estéril (0,9 %) uma vez ao dia durante 2 dias. O BAL foi coletado e o linfonodo mediastinal foi retirado para as análises 24 h após o último desafio. A expressão do GcgR foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.).

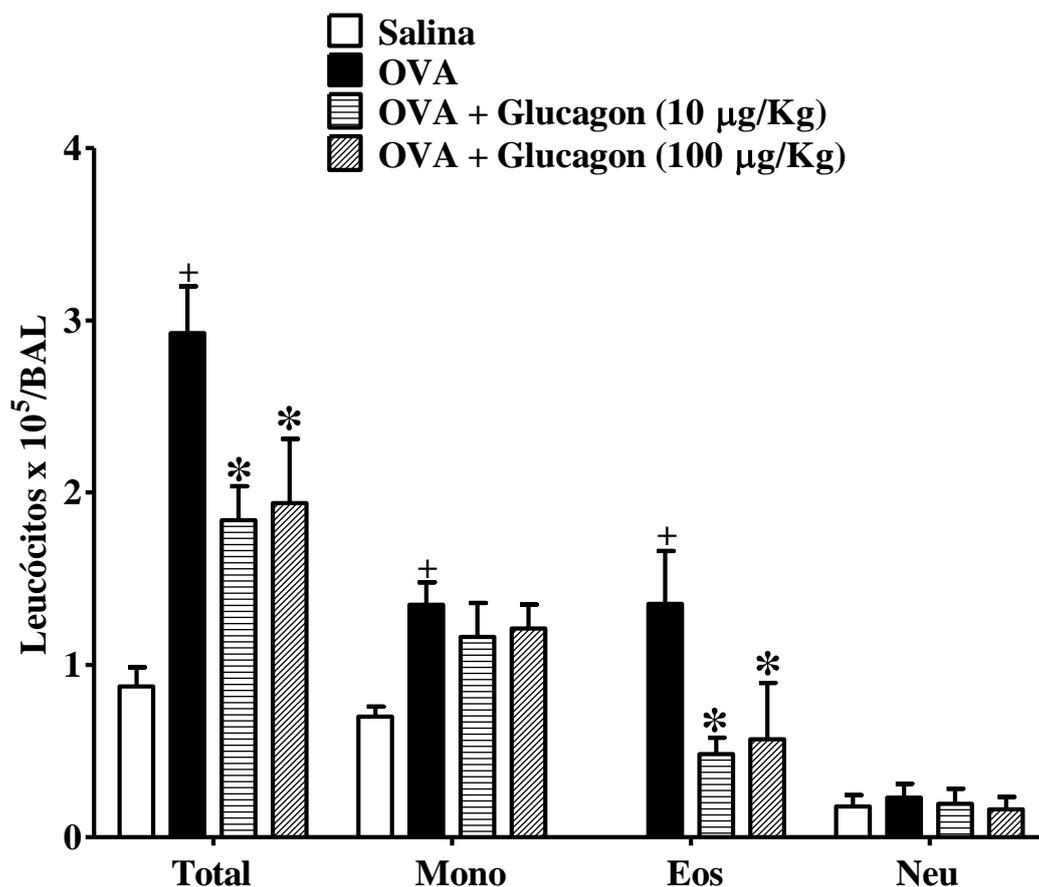


Figura 4.13. Glucagon impede o acúmulo de leucócitos no BAL em modelo murino de asma aguda. Glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) previne o aumento do número de leucócitos totais e eosinófilos no BAL 24 h após o desafio i.n. com OVA (25 µg/25 µL) ou salina estéril (0,9%). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). * $P < 0,05$ em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina. Mono = Mononuclear. Eos = Eosinófilos. Neu = Neutrófilo.

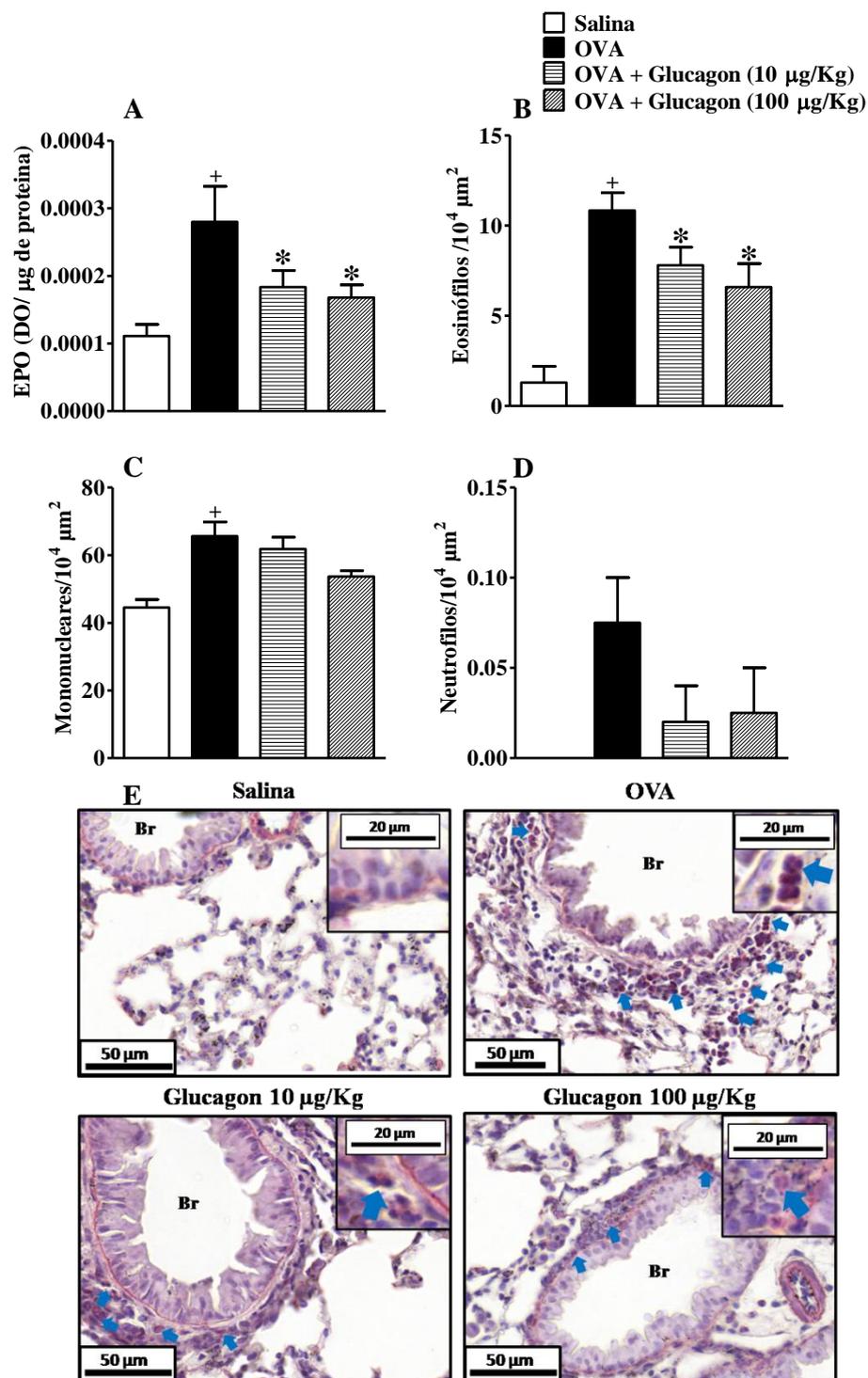


Figura 4.14. Glucagon impede o aumento da atividade de EPO e o infiltrado eosinofílico nos pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA. Quantificação da atividade de EPO (A) e do número de eosinófilos (B), células mononucleares (C) e neutrófilos (D) empulmões de animais tratados com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) e desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. A contagem das células foi realizada com auxílio de um retículo morfométrico em 7 bronquíolos por animal, sendo 3 campos por bronquíolo. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 3-10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. ⁺*P* < 0,05 em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). ^{*} *P* < 0,05 em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina. Fotomicrografias representativas da contagem de células no tecido pulmonar (E). As setas azuis indicam presença de eosinófilos. Br = Luz do bronquíolo.

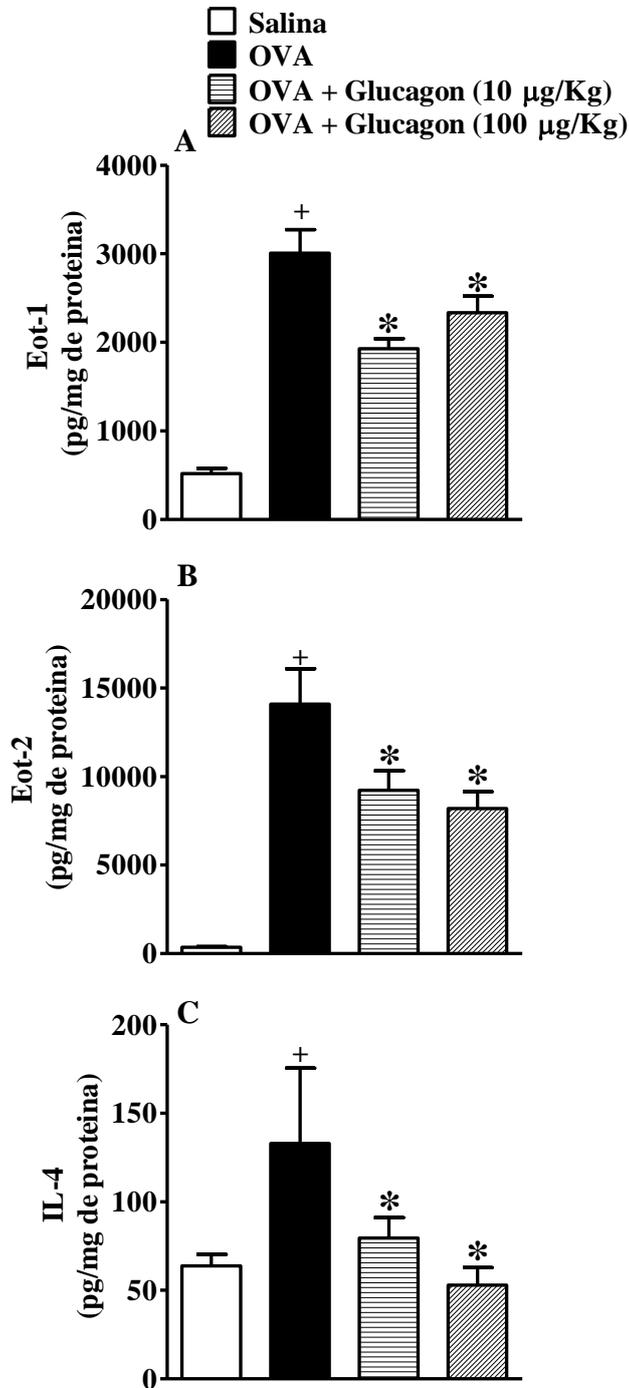


Figura 4.15. Tratamento com glucagon previne o aumento dos níveis de citocinas em pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA. Quantificação dos níveis de Eot-1 (A), Eot-2 (B) e IL-4 (C) em macerado de pulmões de camundongos tratados com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) e desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. A quantificação foi realizada pela técnica de ELISA. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 8-10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. † $P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). * $P < 0,05$ em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina. Eot-1 = Eotaxina-1. Eot-2 = Eotaxina-2. IL-4 = Interleucina-4.

4.10. Glucagon não altera a secreção de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 induzida por IL-13 *in vitro*

A célula epitelial das vias aéreas também tem papel importante na resposta inflamatória da asma, como por exemplo, ela é uma das principais produtoras de eotaxinas nas vias aéreas. Além disso, como alguns resultados acima descreveram que o efeito anti-espasmódico do glucagon depende da ativação do epitélio, fomos investigar se a célula epitelial poderia ser uma célula-alvo para as ações do glucagon observadas no modelo murino de asma aguda. Para isso, nós avaliamos o efeito do glucagon sobre a secreção de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com IL-13 *in vitro*. A IL-13 (12 ng/mL) induziu aumento na liberação de Eot-2 pelas células A549 e a dexametasona (1 μ M) impediu esse aumento *in vitro*. O tratamento com glucagon (0,003 – 1 μ M) *in vitro* não impediu a elevação da secreção de Eot-2 pelas células A549 promovida pela IL-13 *in vitro* (Figura 4.16).

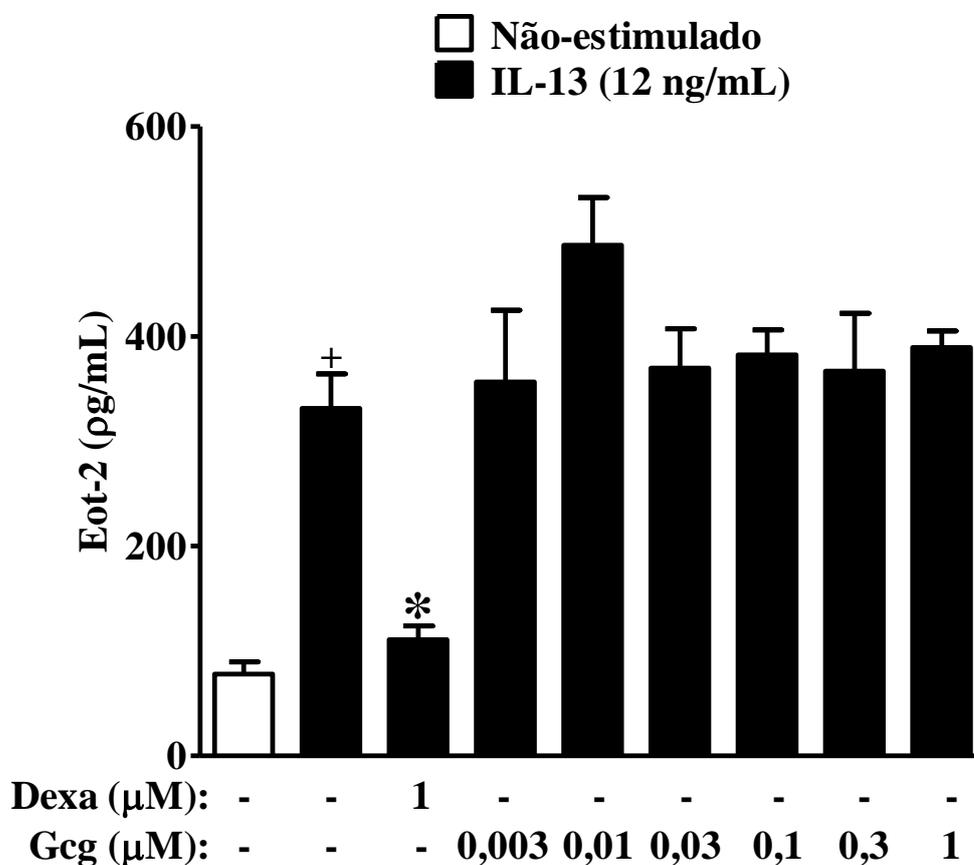


Figura 4.16. Glucagon não apresenta efeito na liberação de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com IL-13 *in vitro*. Efeito do glucagon (0,003 – 1 μM) sobre a secreção de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 estimuladas com IL-13 (12 ng/mL) *in vitro*. A quantificação dos níveis de Eot-2 no sobrenadante dessas células foi determinada através de ELISA 24 h após a exposição ao estímulo com IL-13. O tratamento com dexametasona (1 μM) ou glucagon (0,003-1 μM) foi realizado 30 min antes da estimulação com IL-13 *in vitro*. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4 poços por grupo de um mesmo cultivo celular. Gráfico representativo de 2 experimentos com resultados similares. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. † $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado com IL-13 e tratado somente com salina *in vitro*. Dexa = Dexametasona. Gcg = Glucagon. Eot-2 = Eotaxina-2.

4.11. Tratamento com glucagon impede o acúmulo de linfócitos T α / β promovido pelo desafio intranasal com OVA

Devido a importância dos linfócitos T na fisiopatologia da asma, avaliamos o efeito do glucagon sobre o acúmulo de linfócitos T α β nos pulmões, BAL e linfonodo mediastinal de camundongos instilados com salina estéril (0,9%, i.n.) ou OVA (25 μ g/25 μ L, i.n.). Camundongos desafiados com OVA apresentaram um aumento na expressão das cadeias α e β do TCR em comparação aos animais instilados com salina. Apenas a dose de 100 μ g/Kg, i.n. de glucagon impediu esse aumento na expressão tanto da cadeia β quanto da cadeia α do TCR nos pulmões dos camundongos desafiados com OVA. A dose de 10 μ g/Kg, i.n. de glucagon não teve nenhum efeito sobre a expressão do TCR α β (Figura 4.17).

Em sequência, fomos investigar se o glucagon teria algum efeito sobre a população de linfócitos T no BAL e no linfonodo mediastinal de animais desafiados com OVA. O desafio com OVA (25 μ g/25 μ L, i.n.) induziu uma elevação no número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL (Figuras 4.18A e 4.18B, respectivamente) e no linfonodo mediastinal (Figuras 4.18C e 4.18D, respectivamente) em comparação ao desafio com salina estéril (0,9%, i.n.). Apenas a dose de 100 μ g/Kg de glucagon i.n. impediu o aumento no número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL induzido pelo desafio com OVA (Figuras 4.18A e 4.18B, respectivamente). O mesmo ocorreu nos linfonodos mediastinais, enquanto a dose de 100 μ g/Kg, i.n. impediu a elevação no número de células TCD4⁺ (Figura 4.18C) e de células TCD8⁺ (Figura 4.18D) promovida pela instilação com OVA, a dose de 10 μ g/Kg, i.n também não teve nenhum efeito sobre essas células.

4.12. Glucagon interfere na quantidade de GcgR expresso em células TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL e linfonodo mediastinal que foi alterada pelo desafio intranasal com OVA

Em seguida, fomos avaliar se o desafio com OVA e o tratamento com glucagon interferem nos níveis de GcgR expresso nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ do BAL e linfonodo mediastinal. O desafio com OVA (25 μ g/25 μ L, i.n.) reduziu a expressão do GcgR em células TCD4⁺ (Figuras 4.19A e 4.19B) e aumentou os níveis de GcgR em células TCD8⁺ (Figuras 4.19C e 4.19D) obtidas do BAL em comparação a instilação com salina estéril (0,9 %, i.n.). Ambas as doses do tratamento com glucagon (10 e 100 μ g/Kg, i.n.) impediram a diminuição do GcgR induzida pela OVA em células TCD4⁺ do BAL (Figuras 4.19A e 4.19B). Porém, nenhuma das doses do glucagon interferiram na elevação da expressão de GcgR promovida pela OVA em linfócitos TCD8⁺ (Figuras 4.19C e 4.19D).

No linfonodo mediastinal, ocorreu um aumento da expressão de GcgR em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ após o desafio com OVA em relação a instilação com salina estéril (Figura 4.20). O tratamento com glucagon nas duas doses (10 e 100 µg/Kg, i.n.) foi capaz de impedir essa elevação nos níveis do GcgR nas células TCD4⁺, enquanto apenas a dose de 100 µg/Kg de glucagon preveniu esse aumento na expressão do GcgR nas células TCD8⁺ (Figura 4.20).

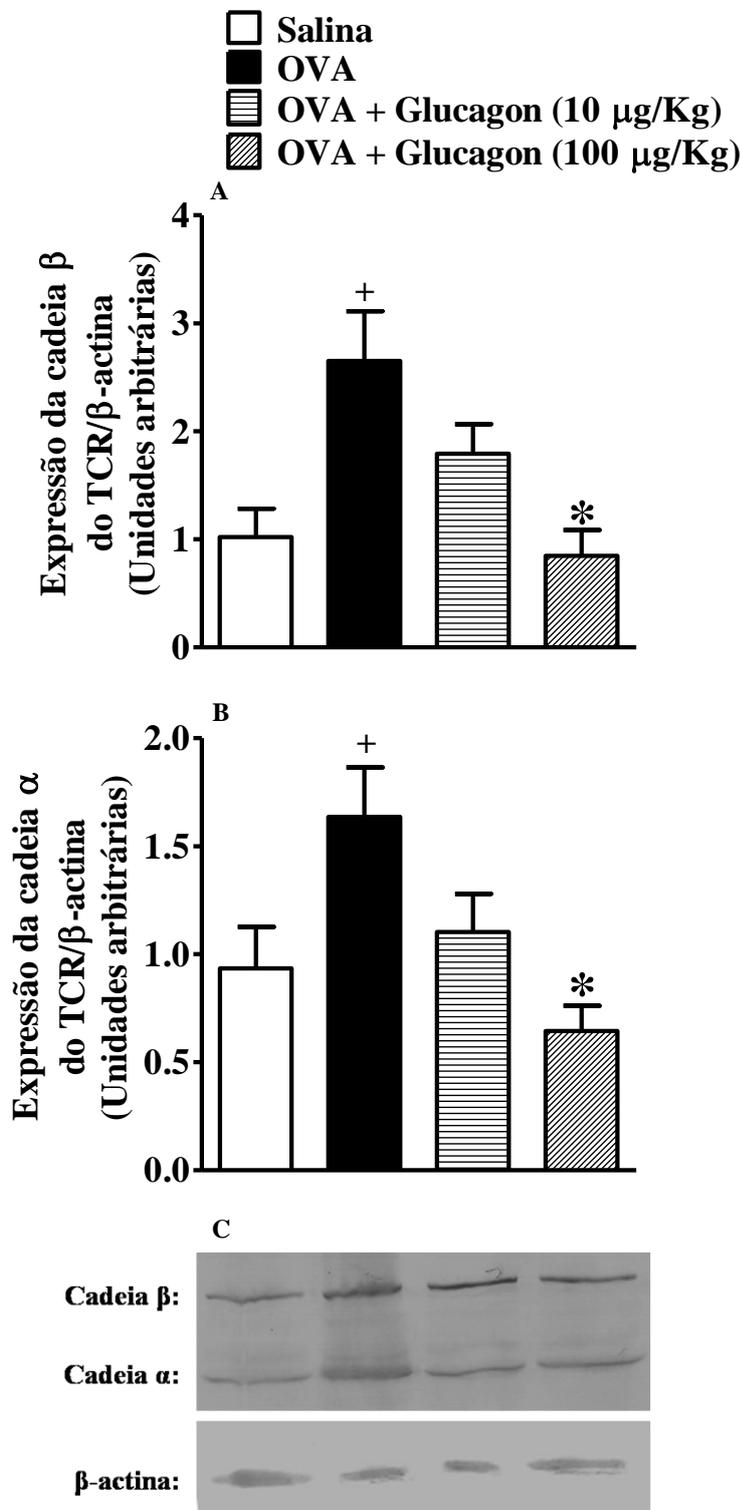


Figura 4.17. Glucagon impede o aumento da expressão do TCR $\alpha\beta$ em pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA. Quantificação da expressão da cadeia β (A) e da cadeia α (B) do TCR nos pulmões de camundongos tratados com glucagon (10 e 100 $\mu\text{g/Kg}$, i.n.) e desafiados com OVA (25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. Imagens representativas (C) da expressão do TCR $\alpha\beta$ que foi determinada por *Western blot*. Os dados foram normalizados pela expressão da β -actina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de 4-5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. ⁺ $P < 0,05$ em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). ^{*} $P < 0,05$ em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina.

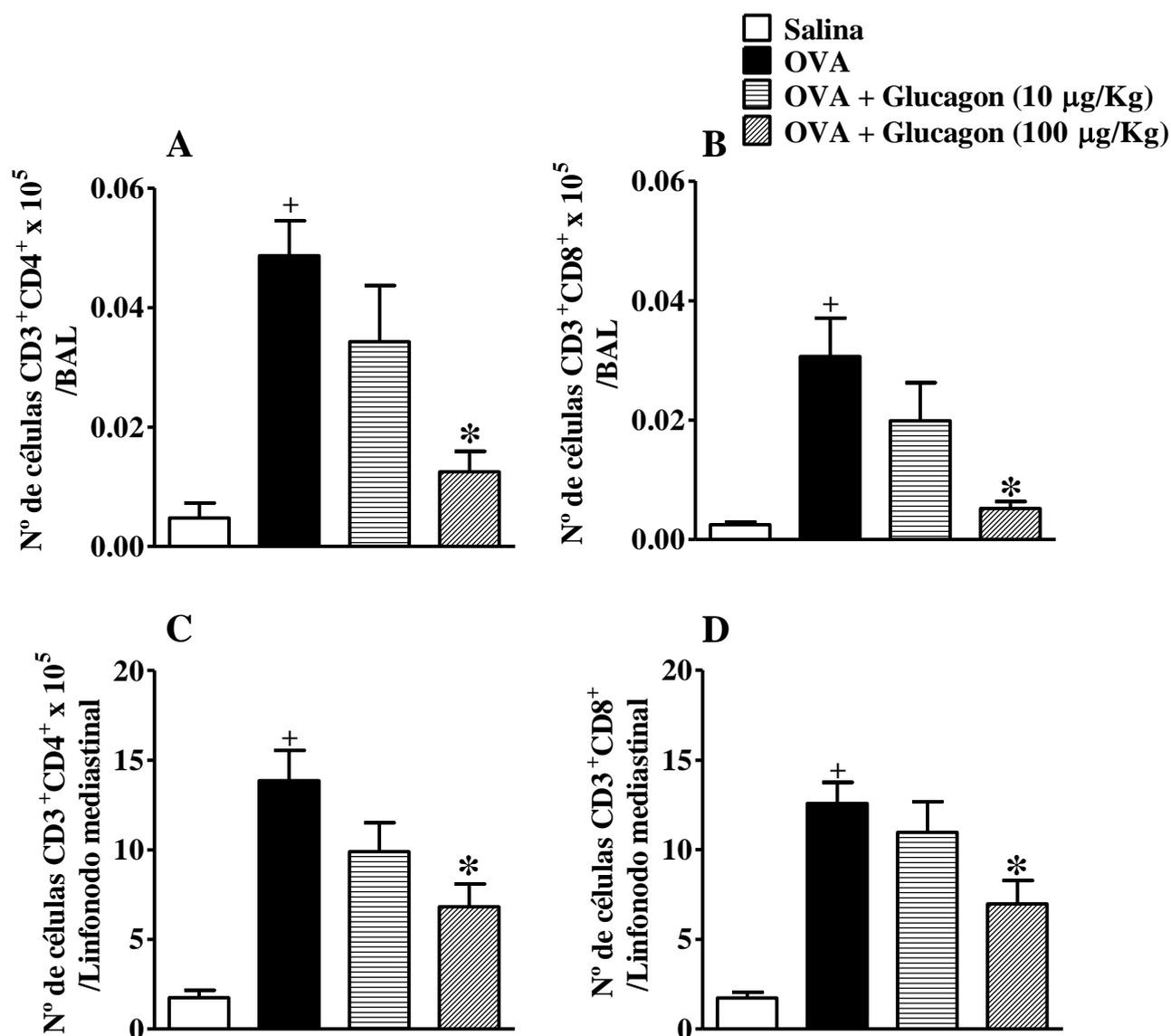


Figura 4.18. Glucagon impede a elevação do número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL e linfonodo mediastinal de camundongos A/J desafiados com OVA. Número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL (A e B, respectivamente) e no linfonodo mediastinal (C e D, respectivamente) de animais tratados com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) e desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. O BAL foi coletado e o linfonodo mediastinal foi retirado para as análises 24 h após o último desafio. A contagem de células TCD4⁺ e TCD8⁺ foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. +*P* < 0,05 em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). * *P* < 0,05 em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina.

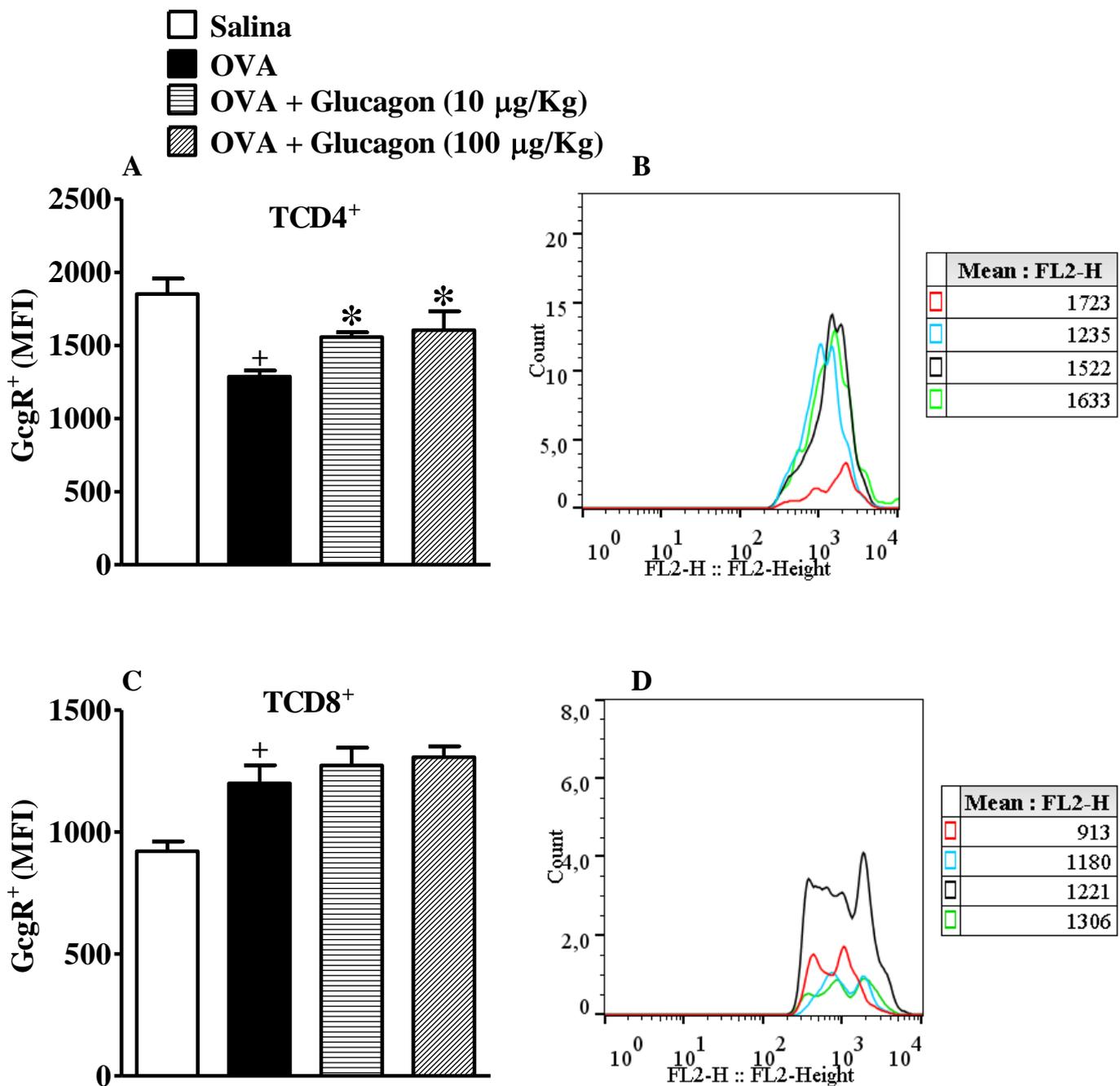


Figura 4.19. Glucagon impede a redução na expressão de GcgR em células TCD4⁺ mas não impede o aumento dos níveis de GcgR em linfócitos TCD8⁺ no BAL de camundongos A/J desafiados com OVA. Média de intensidade de fluorescência (MFI) para o GcgR em linfócitos TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (C) do BAL. Histogramas representativos da MFI do GcgR em células TCD4⁺ (B) e TCD8⁺ (D) de cada grupo experimental (Vermelho = Salina; Azul = OVA; Preto = Glucagon 10 µg/Kg e Verde = Glucagon 100 µg/Kg). Os animais foram tratados com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) e desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. O BAL foi coletado 24 h após o último desafio. A contagem de células TCD4⁺, TCD8⁺ e a expressão do GcgR foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4-5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. +*P* < 0,05 em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). * *P* < 0,05 em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina.

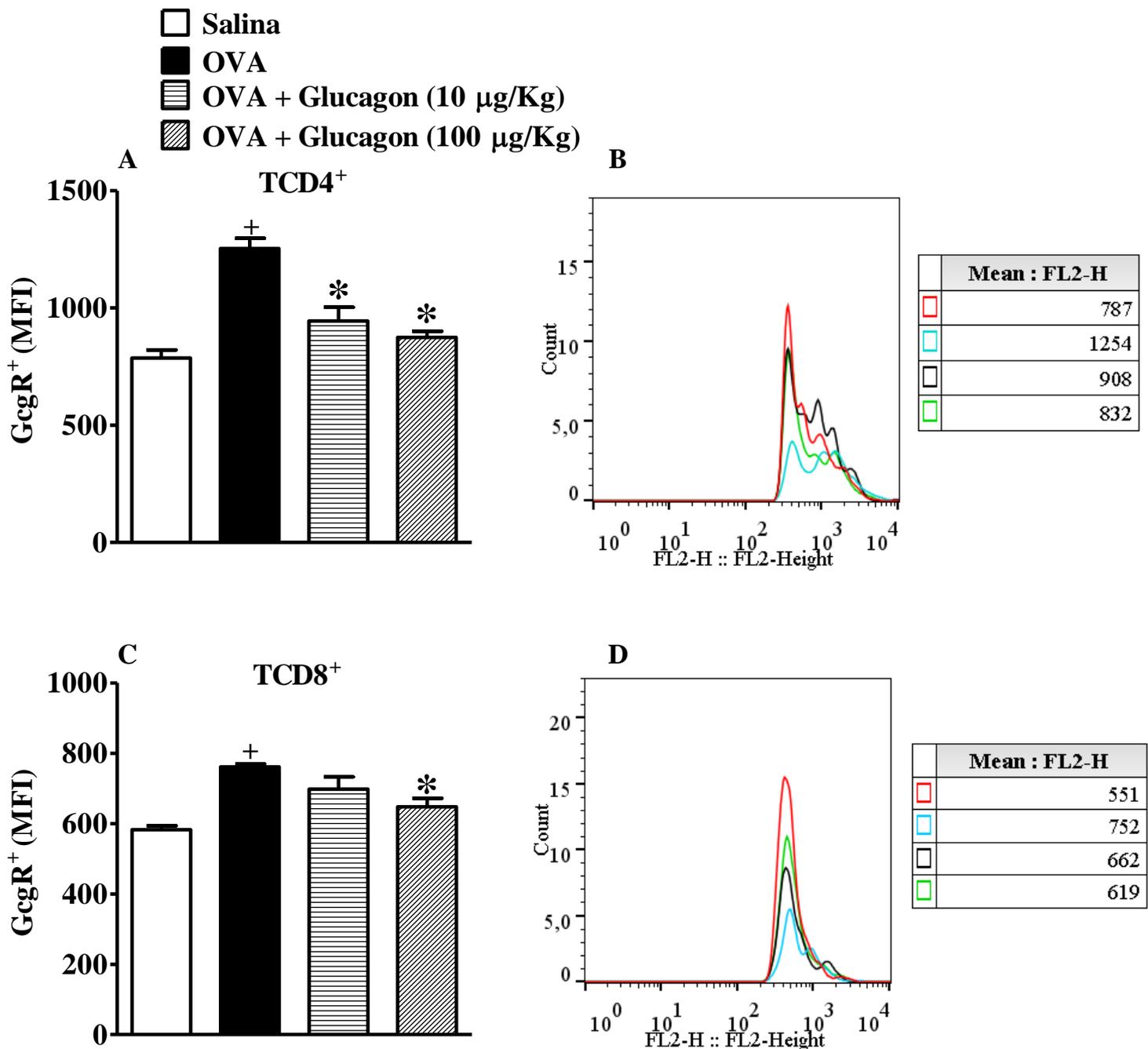


Figura 4.20. Glucagon impede a elevação dos níveis de GcgR em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no linfonodo mediastinal de camundongos A/J desafiados com OVA. Média de intensidade de fluorescência (MFI) para o GcgR em linfócitos TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (C) do linfonodo mediastinal. Histogramas representativos da MFI do GcgR em células TCD4⁺ (B) e TCD8⁺ (D) de cada grupo experimental (Vermelho = Salina; Azul = OVA; Preto = Glucagon 10 µg/Kg e Verde = Glucagon 100 µg/Kg). Os animais foram tratados com glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) e desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. A contagem de células TCD4⁺, TCD8⁺ e a expressão do GcgR foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 5-6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. +*P* < 0,05 em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). * *P* < 0,05 em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina.

4.13. Glucagon inibe a ativação de linfócitos T estimulados com anti-CD3 ou OVA *in vitro*

Baseados nos efeitos do glucagon *in vivo* no modelo murino de asma aguda induzida por OVA que apontaram o linfócito T como uma possível célula-alvo para o glucagon, fomos investigar a ação direta do glucagon sobre a ativação de linfócitos T *in vitro*. Utilizamos 2 protocolos de estimulação de células T *in vitro*. No primeiro protocolo, células obtidas de linfonodos cervicais, axilares e inguinais de camundongos A/J foram tratadas com dexametasona (1 μM) ou glucagon (0,03 – 30 μM) e estimuladas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) *in vitro* durante 72 h. A estimulação com anti-CD3 promoveu um aumento na proliferação dos linfócitos T e o tratamento com dexametasona (1 μM) *in vitro* inibiu essa resposta proliferativa. O glucagon nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM também foi capaz de bloquear a proliferação das células T induzida pelo anti-CD3 *in vitro*. Entretanto, a concentração de 0,03 μM de glucagon não exerceu efeito algum sobre a resposta proliferativa dessas células (Figura 4.21).

Como observado na figura 4.22, a incubação com anti-CD3 *in vitro* provocou um aumento na secreção de IL-2, IL-17, IL-10, IFN- γ e TNF- α pelos linfócitos T. O tratamento tanto com dexametasona (1 μM) quanto com glucagon na concentração de 3 μM *in vitro* inibiu a elevação dos níveis dessas citocinas no sobrenadante dos linfócitos T estimulados com anti-CD3 *in vitro*. A concentração de 0,3 μM de glucagon impediu o aumento da secreção de IL-10 e IFN- γ (Figuras 4.22C e 4.22D, respectivamente), enquanto a concentração de 0,03 μM de glucagon apresentou efeito inibitório apenas nos níveis da citocina IL-10 (Figura 4.22C). O glucagon exerceu todos esses efeitos sem alterar a viabilidade dos linfócitos T estimulados com anti-CD3 *in vitro* (Não-estimulado: $91,76 \pm 1,99$; Anti-CD3: $93,08 \pm 2,77$; Dexametasona 1 μM : $90,44 \pm 1,00$; Glucagon 0,03 μM : $97,88 \pm 1,55$; Glucagon 0,3 μM : $95,98 \pm 1,12$ e Glucagon 3 μM : $95,92 \pm 0,53$; % de células viáveis; média \pm E.P.M., n=5).

No segundo protocolo, as células foram obtidas de um *pool* de linfonodos cervicais, axilares e inguinais de camundongos transgênicos DO11.10 com TCR específico para OVA. Essas células foram tratadas com dexametasona (1 μM) ou glucagon (1 – 10 μM) e simultaneamente foram estimuladas com OVA (0,5 mg/mL) durante 72 h. A OVA estimulou a proliferação de células T (Figura 4.23A) e em paralelo induziu um aumento no percentual de células TCD4⁺ (Figura 4.23B). A dexametasona (1 μM) inibiu ambos os fenômenos (Figura 4.23). O glucagon nas concentrações de 1 e 3 μM impediu o aumento da resposta

proliferativa e do percentual de células TCD4⁺ induzida pela OVA *in vitro*, porém a concentração de 10 μM de glucagon exerceu efeito inibitório apenas sobre a elevação do percentual dos linfócitos TCD4⁺(Figura 4.23). Além disso, foi observado que o glucagon não interferiu na viabilidade dos linfócitos T ativados com OVA *in vitro* para desempenhar suas ações (Não-estimulado: 86,0 ± 0,79; OVA: 92,62 ± 0,47; Dexametasona 1 μM: 88,88 ± 2,09; Glucagon 1 μM: 92,50 ± 1,46; Glucagon 3 μM: 95,06 ± 1,29 e Glucagon 10 μM: 96,48 ± 1,04; % de células viáveis; média ± E.P.M., n=5).

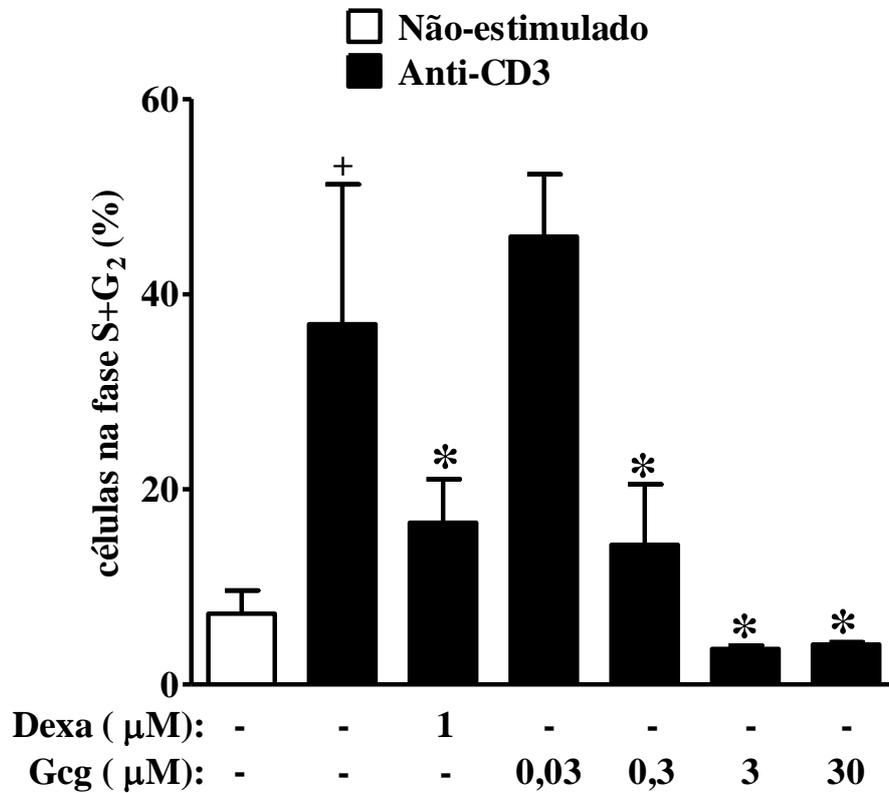


Figura 4.21. Glucagon reduz a resposta proliferativa de linfócitos T ativados com anti-CD3 *in vitro*. Efeito do glucagon (0,03 – 30μM) sobre a proliferação de células recuperadas de linfonodos de camundongos A/J e estimuladas com anti-CD3 (1 μg/mL) *in vitro*. A porcentagem de células em proliferação foi determinada através de citometria de fluxo utilizando a marcação com iodeto de propídio 72 h após a exposição ao anti-CD3. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 3-4 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. † $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado com anti-CD3 e tratado somente com salina *in vitro*. Dexa= Dexametasona. Gcg = Glucagon.

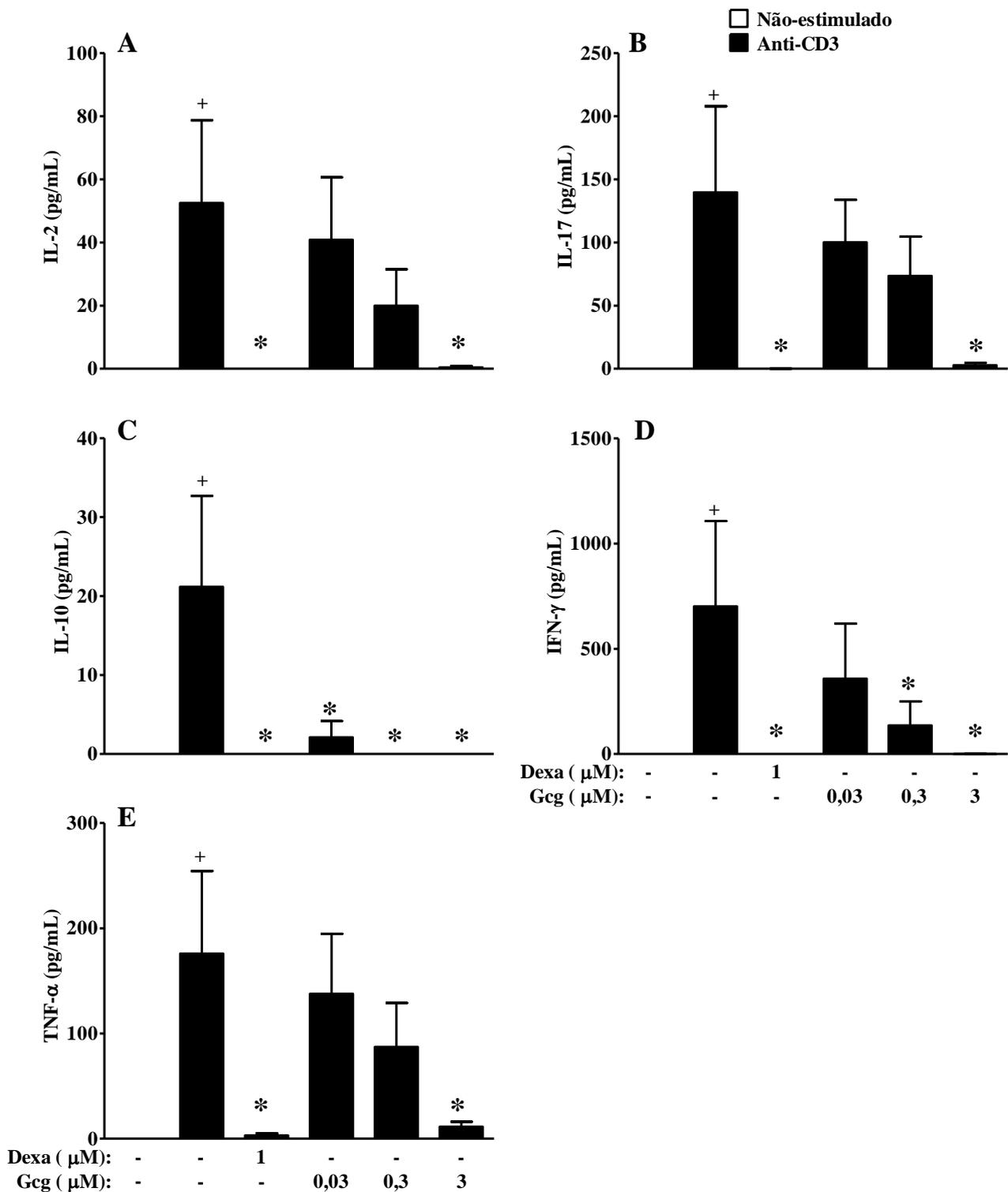


Figura 4.22. Glucagon impede a secreção de citocinas pelos linfócitos T ativados com anti-CD3 *in vitro*. Efeito do glucagon (0,03 – 3 μM) sobre a secreção de IL-2 (A), IL-17 (B), IL-10 (C), IFN-γ (D) e TNF-α (E) pelas células recuperadas de linfonodos de camundongos A/J e estimuladas com anti-CD3 (1 μg/mL) *in vitro*. A quantificação dos níveis dessas citocinas no sobrenadante dessas células foi determinada através de citometria de fluxo utilizando o kit *CBA* 72 h após a exposição ao anti-CD3. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 3-4 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado com anti-CD3 e tratado somente com salina *in vitro*. Dexa = Dexametasona. Gcg = Glucagon.

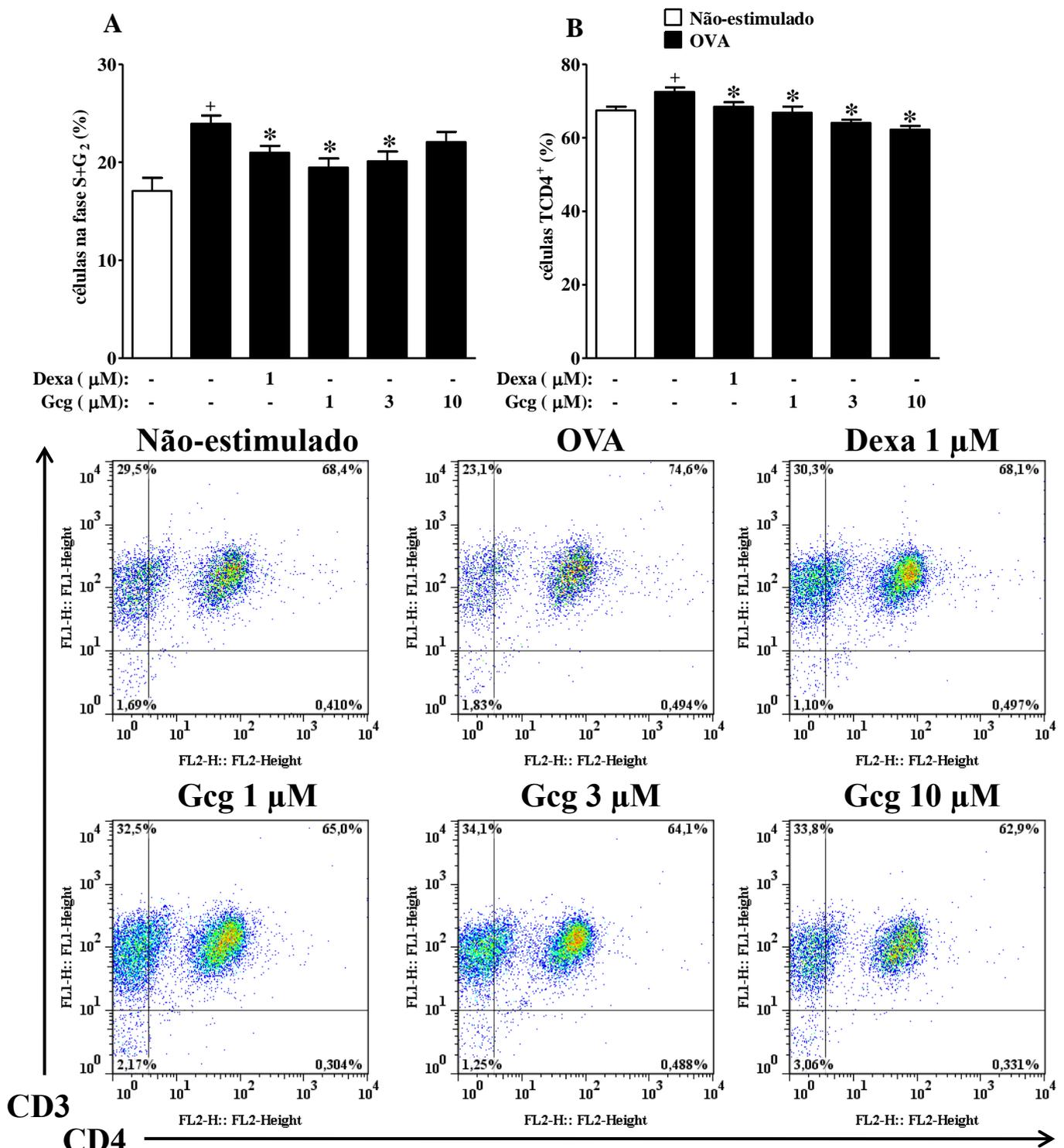


Figura 4.23. Glucagon impede o aumento da proliferação de linfócitos T ativadas com OVA *in vitro* e inibe a elevação percentual da população de linfócitos TCD4⁺. Efeito do glucagon (1 – 10 μM) sobre a proliferação de linfócitos T (A) e sobre o percentual de células TCD4⁺ (B) estimuladas com OVA (0,5 mg/mL) *in vitro*. Dot plots representativos da marcação positiva de CD3 e CD4 em cada grupo (C). As células foram obtidas de linfonodos de camundongos transgênicos DO11.10 com TCR específico para OVA. A percentagem de células em proliferação e de células TCD4⁺ foi determinada através de citometria de fluxo 72 h após a exposição a OVA. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 4-10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. * $P < 0,05$ em comparação ao grupo estimulado com OVA e tratado somente com salina *in vitro*. Dexa= Dexametasona. Gcg = Glucagon.

4.14. Glucagon impede a hiper-reatividade das vias aéreas a metacolina no modelo murino de asma aguda induzida por OVA

A inflamação contínua das vias aéreas está associada ao fenômeno de hiper-reatividade das mesmas, que assim como a resposta inflamatória é considerada uma das principais características da asma. Sendo assim, fomos avaliar o efeito do tratamento do glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas induzida por OVA. Com relação a análise da hiper-reatividade das vias aéreas, observamos que a metacolina promoveu aumento da RL e redução da Cdyn de forma concentração-dependente (3, 9 e 27 mg/mL). Nos camundongos submetidos ao desafio com OVA (25 µg/25 µL, i.n.) o aumento da RL e a diminuição da Cdyn foram mais acentuados do que nos animais instilados apenas com salina estéril (0,9%, i.n.), o que foi definido como a ocorrência de uma hiper-reatividade das vias aéreas no grupo desafiado com OVA. A administração i.n. com glucagon (10 e 100 µg/Kg) 1 h antes de cada desafio com OVA preveniu essa resposta exacerbada à metacolina em ambos os parâmetros analisados, RL (Figuras 4.24A e 4.24B) e Cdyn (Figuras 4.24C e 4.24D).

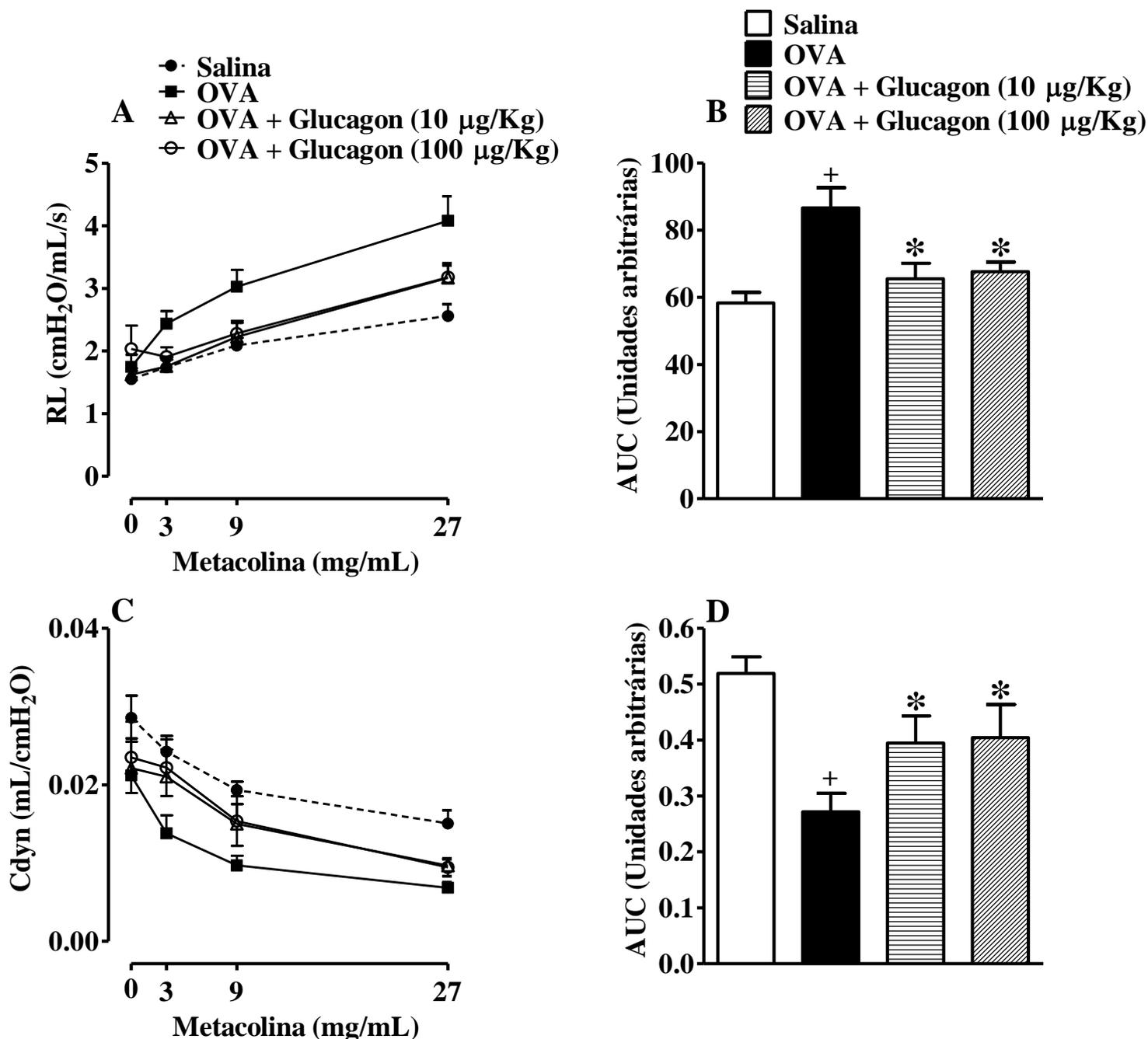


Figura 4.24. Administração de glucagon impede a hiper-reatividade das vias aéreas a metacolina induzida pela OVA. Análise do efeito anti-espasmódico do glucagon (10 e 100 µg/Kg, i.n.) sobre o aumento de RL (A) e redução da Cdyn (C) induzidos pela metacolina (0 - 27 mg/mL) em camundongos A/J desafiados i.n. com OVA (25 µg/25 µL) ou salina estéril (0,9%). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. AUC foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta da RL (B) e Cdyn (D) após exposição a metacolina (0 - 27 mg/mL). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 7-8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. ⁺*P* < 0,05 em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). ^{*} *P* < 0,05 em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina.

4.15. Administração de glucagon previne a deposição de matriz extracelular peribronquiolar no modelo murino de asma aguda induzida por OVA

A perpetuação da resposta inflamatória na asma desencadeia o remodelamento das vias aéreas. A fim de determinar se o glucagon teria algum efeito sobre o remodelamento das vias aéreas, avaliamos a fibrose subepitelial através da quantificação da deposição de matriz extracelular corada com Tricrômio de Masson. Como mostrado nas fotomicrografias, camundongos A/J instilados com salina (0,9%, i.n.) apresentaram um perfil normal de deposição de matriz extracelular pulmonar. Nos animais desafiados com OVA (25 µg/25 µL, i.n.), podemos observar um acúmulo de matriz nas aéreas peribronquiolares, o que caracterizou um quadro de fibrose subepitelial. O tratamento com glucagon na dose de 100 µg/Kg, i.n. impediu esse aumento de matriz extracelular. Entretanto, a dose de 10 µg/Kg, i.n. de glucagon não foi capaz de impedir esse fenômeno (Figura 4.25A). Esses dados foram confirmados pela quantificação digital dos componentes da matriz extracelular corados com Tricrômio de Masson (Figura 4.25B).

4.16. Glucagon não impede a proliferação de fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 *in vitro*

Visto que o glucagon foi capaz de inibir o aumento do depósito de matriz extracelular nos animais desafiados com OVA e sabendo da importância dos fibroblastos para esse fenômeno de fibrose subepitelial, fomos avaliar a ação do glucagon sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares. Para isso, fibroblastos obtidos a partir dos pulmões de camundongos A/J foram tratados com glucagon (0,1 – 10 µM) *in vitro* e 1 h após foram estimulados com IL-13 (40 ng/mL). A proliferação foi determinada pela taxa de timidina-3H incorporada ao DNA celular. A incubação com IL-13 *in vitro* estimulou a proliferação de fibroblastos pulmonares. O tratamento prévio com glucagon não foi capaz de impedir essa resposta proliferativa em nenhuma das concentrações utilizadas desse hormônio (Figura 4.26).

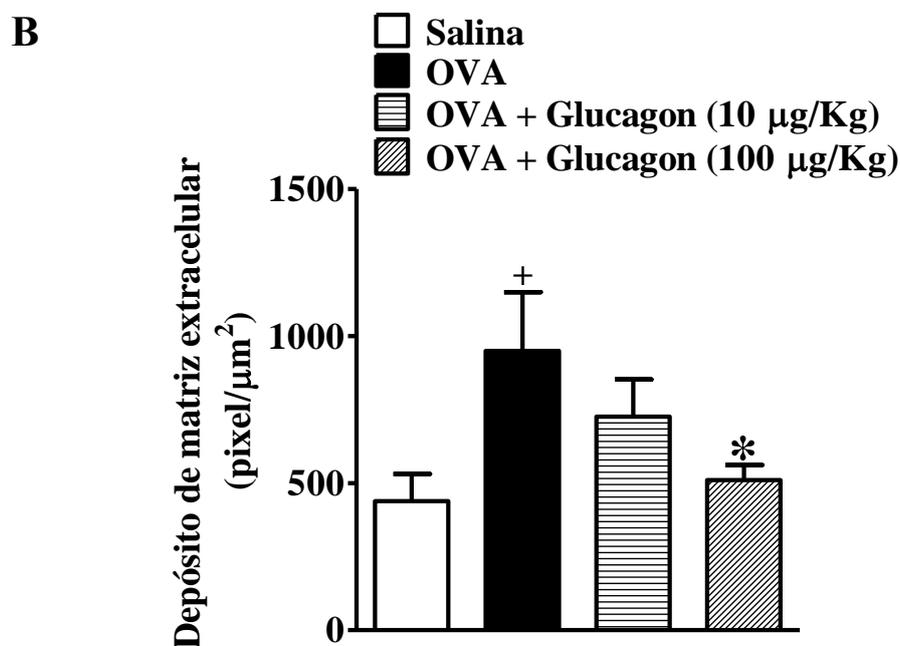
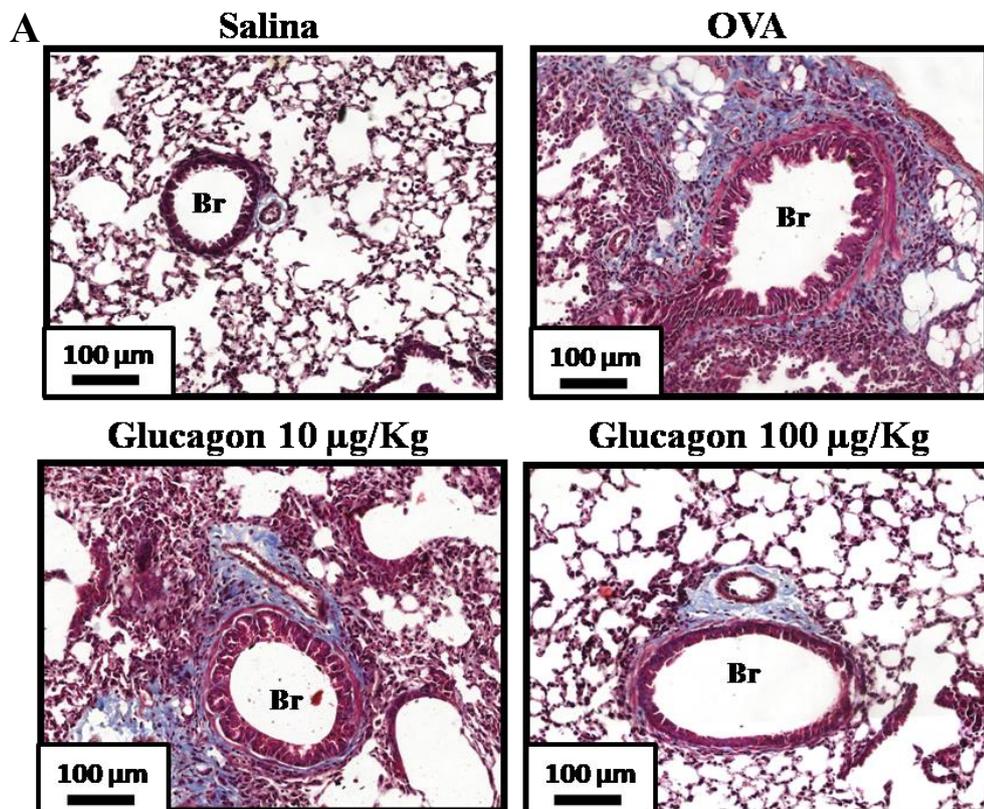


Figura 4.25. Glucagon impede a fibrose subepitelial nos pulmões de camundongos A/J desafiados com OVA. Fotomicrografias representativas das secções histológicas coradas com Tricrômio de Masson (A) e quantificação digital da deposição da matriz extracelular peribronquiolar nas secções histológicas (B) dos pulmões de camundongos tratados com glucagon (10 e 100 μg/Kg, i.n.) e desafiados com OVA (25 μg/25 μL, i.n.) ou salina estéril (0,9 %, i.n.). O desafio foi realizado 1 h após o tratamento com glucagon, uma vez ao dia, durante 2 dias. A quantificação digital foi realizada em 8-10 vias aéreas de cada animal. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. ⁺*P* < 0,05 em comparação ao grupo instilado com salina (0,9%, i.n.). ^{*} *P* < 0,05 em comparação ao grupo desafiado com OVA e tratado somente com salina. Br = Luz do bronquíolo.

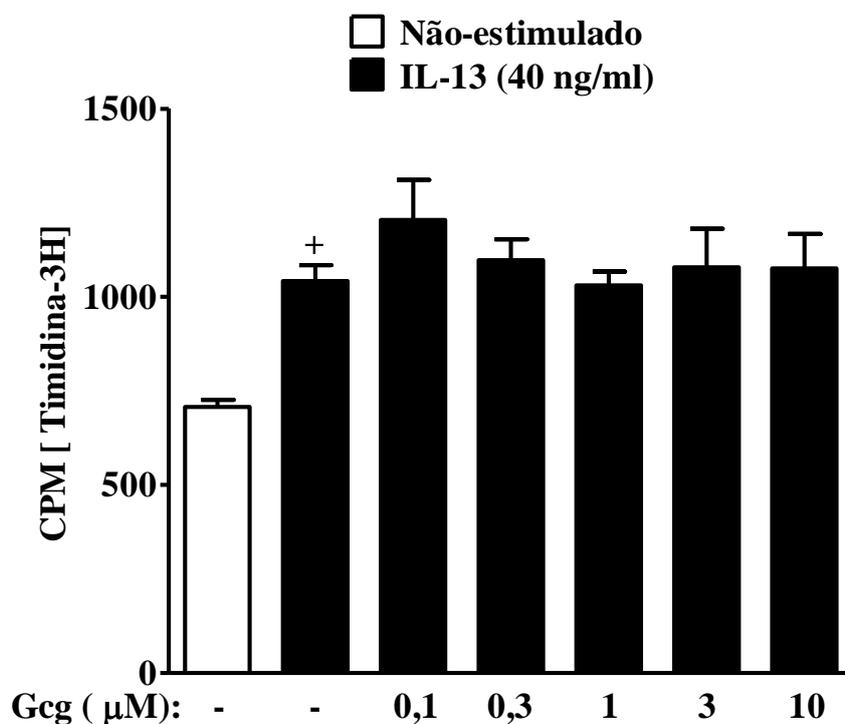


Figura 4.26. Glucagon não é capaz de impedir a proliferação de fibroblastos pulmonares induzida por IL-13 *in vitro*. Efeito do glucagon (0,1 – 10 μM) sobre a proliferação de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos A/J. A taxa de proliferação foi determinada através da quantificação da incorporação com timidina-3H ao DNA celular utilizando cintilografia em contador β 24 h após a exposição a IL-13 (40 ng/mL). Os resultados são expressos como média ± E.P.M. de 6 poços por grupo de um mesmo pool de 5 animais. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Student Newman-Keuls*. + $P < 0,05$ em comparação ao grupo não-estimulado. Gcg = Glucagon. Gráfico representativo de 3 experimentos idênticos com resultados similares.

5. Discussão

No presente estudo, nós investigamos qual seria o efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas de camundongos e também avaliamos a ação do glucagon sobre a hiper-reatividade das vias aéreas e desenvolvimento da resposta inflamatória em modelos murino de inflamação pulmonar. Constatamos que o glucagon apresentou efeito anti-espasmódico sobre a contração do músculo liso das vias aéreas induzida por agentes colinérgicos *in vitro* e *in vivo*, e que os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito incluem a ativação do GcgR presente no epitélio das vias aéreas com consequente liberação de NO e de produtos da ativação de COX-1, como a PGE₂. Além disso, a administração i.n. com glucagon impediu a hiper-reatividade das vias aéreas frente ao estímulo com metacolina no modelo experimental de LPA/SDRA desencadeada pela exposição ao LPS e no modelo de asma aguda caracterizado pelo desafio antigênico com OVA. Em paralelo, o tratamento com glucagon impediu o recrutamento de células inflamatórias no BAL de animais estimulados com LPS ou OVA. No modelo experimental de asma, observamos também que o glucagon impediu o aumento no número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL e nos linfonodos mediastinais e preveniu o aumento dos níveis de citocinas, do número de eosinófilos, da expressão do TCR e o depósito de MEC no tecido pulmonar. Finalmente, o glucagon impediu tanto a quimiotaxia de PMNs humanos, que expressam o GcgR, induzida por IL-8 *in vitro* quanto a proliferação e secreção de citocinas por linfócitos T ativados com anti-CD3 ou OVA *in vitro*. Entretanto, o glucagon não foi capaz de alterar a resposta proliferativa de fibroblastos pulmonares estimulados com IL-13 *in vitro* e nem de atuar sobre a ativação com LPS ou IL-13 de células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 *in vitro*.

Nossa primeira célula-alvo nesse estudo foi o músculo liso das vias aéreas que é um dos principais responsáveis pela reatividade dessas vias. A alteração no funcionamento do músculo liso e na reatividade das vias aéreas está associada a fisiopatologia de várias doenças pulmonares (32). No sistema de banho de órgão isolado, o carbacol promoveu a contração da musculatura lisa de traqueias *in vitro* de forma concentração-dependente (ver Figura 4.1). Esse efeito do carbacol já era esperado uma vez que ele, assim como a ACh, é um agonista colinérgico e portanto ao atuarem sobre receptores muscarínicos M₃ no músculo liso das vias aéreas induzem a contração dessa célula através da produção de IP₃ e DAG que desencadeiam um aumento na concentração intracelular de Ca⁺² (26, 36). A preferência pela utilização do carbacol em relação a ACh é explicada pelo fato do carbacol ser degradado pelas colinesterases de forma mais lenta do que a ACh e, com isso, o efeito do carbacol dura mais

tempo do que a ação da ACh (31, 174), o que propicia uma margem de tempo maior para a execução dos experimentos.

O glucagon, nas concentrações de 0,1 e 1 μ M, impediu a contração do músculo liso de traqueias induzida por carbacol *in vitro* (ver Figura 4.1). Esse resultado está em acordo com um estudo na literatura que descreveu um efeito relaxante do músculo liso brônquico de cobais promovido pelo glucagon *in vitro* (150). Outros peptídeos da mesma família do glucagon, como o VIP e PACAP (120) também são capazes de inibir a contração do músculo liso das vias aéreas *in vitro* (175, 176). Esse efeito relaxante sobre a musculatura lisa das vias aéreas é comum a esses peptídeos pode estar relacionado com a existência de uma homologia entre as sequências de aminoácidos desses peptídeos (121, 122) e com a ligação desses peptídeos aos seus respectivos receptores cuja ativação culmina na elevação dos níveis intracelulares de AMPc (177). Apesar de todas essas semelhanças entre esses peptídeos, o glucagon não se liga aos receptores de VIP e PACAP e nem vice-versa (178), o que sugere que o glucagon possua um alvo diferente de VIP e PACAP para a promoção dos seus efeitos.

Ambas as concentrações de glucagon reduziram os valores de Emax do carbacol mas não interferiram com os valores de pEC50 desse agonista colinérgico (ver Tabela 4.1), o que significa que o glucagon inibe o efeito máximo mas não atua sobre a potência do carbacol. Esses dados sugerem que o glucagon não esteja atuando como modulador ortostérico dos receptores do carbacol na musculatura lisa das vias aéreas, o que nos faz hipotetizar que o efeito anti-espasmódico do glucagon seja num alvo diferente dos receptores de carbacol. Como a concentração de 1 μ M de glucagon foi a que exerceu melhor ação anti-espasmódica *in vitro*, decidimos utilizar apenas essa concentração de glucagon em traqueias nos experimentos seguintes.

Em seguida, fomos investigar se o efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro* era dependente da ativação do seu receptor (GcgR). Nós mostramos que a inibição da AC com SQ 22.536 reduziu a atividade anti-espasmódica do glucagon sobre a contração traqueal promovida pelo carbacol *in vitro* (ver Figura 4.2A), indicando que a ativação da AC está envolvida nesse efeito do glucagon. Essa estimulação da AC pelo glucagon vai ao encontro da literatura onde é bem sedimentado que o GcgR está acoplado a uma proteína Gs que ativa a AC e dessa forma leva a produção intracelular de AMPc (132). Além disso, nós também mostramos que o antagonista do GcgR (des-His1-[Glu9]-glucagon-amida) aboliu a ação anti-espasmódica do glucagon sobre a contração do músculo liso de traqueias induzida pelo carbacol *in vitro* (ver Figura 4.2B), o que confirmou nossa hipótese de que esse efeito do

glucagon ocorre através da ativação do GcgR. Também avaliamos se o efeito anti-espasmódico do glucagon seria dependente da ativação do epitélio, visto que a liberação de fatores pelas células epiteliais é uma das principais formas de relaxar a musculatura lisa das vias aéreas (36, 179). Para isso, o epitélio de algumas traqueias foi removido pela fricção mecânica da superfície interna traqueal com uma fina pinça de prata. Essa metodologia já é bem estabelecida no nosso grupo, que em trabalhos anteriores comprovou através de análise histológica a ausência total de epitélio nas traqueias que foram submetidas a esse processo de desepitelização (160). De forma surpreendente, a atividade anti-espasmódica do glucagon sobre a contração traqueal induzida pelo carbacol foi bloqueada após a remoção do epitélio traqueal (ver Figura 4.3A), o que mostra o papel crucial das células epiteliais nesse efeito protetor do glucagon. Esse resultado foi inesperado, uma vez que a elevação dos níveis intracelulares de AMPc no músculo liso das vias aéreas conduz a um relaxamento dessa célula (37). Uma possível explicação seria que talvez a quantidade de GcgR presente na musculatura lisa das vias aéreas sem epitélio seja tão pequena que não é suficiente para induzir um sinal capaz de relaxar o músculo liso diretamente.

A observação de que a integridade da camada epitelial das vias respiratórias é essencial para a atividade anti-espasmódica do glucagon *in vitro* mostra que as células epiteliais não só proporcionam uma barreira física que protege o organismo contra microorganismos, gases e alérgenos, mas também regulam ativamente a maquinaria contrátil do músculo liso (36, 180). De fato, a capacidade do epitélio de secretar fatores capazes de relaxar o músculo liso é bem consolidada. Esses fatores incluem NO, PGE₂, PGI₂, dentre outros (36, 42). Testamos alguns inibidores para identificar quais fatores liberados pelo epitélio poderiam ser responsáveis pela ação do glucagon. Observamos que o efeito protetor do glucagon sobre a contração de traqueias induzida por carbacol *in vitro* não foi modificado pelo inibidor seletivo de COX-2, NS-398 (ver Figura 4.3D), o que descarta o envolvimento de fatores derivados de COX-2 nesse efeito. Porém, a ação anti-espasmódica do glucagon foi sensível a pré-incubação com o inibidor de NOS, L-NAME, e com o inibidor seletivo de COX-1, SC-560 *in vitro* (ver Figuras 4.3B e 4.3C). Esses resultados sugerem que tanto o NO quanto os metabólitos de COX-1 participam do efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro*.

Após, fomos verificar se o glucagon seria capaz de apresentar atividade anti-espasmódica sobre a contração da musculatura lisa *in vivo*. No sistema de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasivo realizamos uma curva dose-resposta do glucagon (0,1, 1 e 10 µg/Kg, i.n.). A metodologia invasiva foi escolhida porque nos fornece valores de RL e

Cdyn que são considerados parâmetros ouro de análise da função pulmonar e, porque podemos administrar controladamente os agentes broncoconstritores diretamente nos pulmões. Porém, nessa metodologia necessitamos utilizar anestesia e não podemos realizar uma cinética temporal no mesmo animal (181). Para a contração da musculatura lisa das vias aéreas *in vivo* utilizamos a metacolina como agonista colinérgico no lugar do carbacol pois queríamos mimetizar o que acontece nos testes de broncoprovocação da clínica médica, onde o principal agente broncoconstrictor é a metacolina (182).

A metacolina aumentou a RL e reduziu a Cdyn dos camundongos A/J de forma concentração-dependente (ver Figura 4.4), o que já era esperado uma vez que a metacolina induz contração do músculo liso das vias aéreas (183). Essa contração diminui o diâmetro dessas vias, dificultando a passagem do ar o que eleva a RL que é caracterizada pela oposição ao fluxo de ar no sistema respiratório(14, 16, 17). Apesar da elasticidade do tecido pulmonar ser o principal fator que interfere na Cdyn (15), que é a capacidade de expansão dos pulmões (19), a contração da musculatura lisa das vias aéreas também pode influenciar na Cdyn (15). Inclusive, já foi demonstrada uma diminuição da Cdyn ocorrendo simultaneamente a contração muscular lisa das vias aéreas (21).

O tratamento i.n. com glucagon na dose de 1 µg/Kg realizado 3 h antes dos animais serem inseridos no peltismógrafo invasivo inibiu o aumento de RL e a redução de Cdyn promovidos pela metacolina (ver Figura 4.4). Esse tempo de 3 h foi determinado a partir de dados do próprio grupo que mostraram que a ação do glucagon de inibir a broncoconstrição induzida pela metacolina em sistema barométrico de corpo inteiro não-invasivo é melhor evidenciada no tempo de 3 h após a sua administração. A dose de 0,1 µg/Kg de glucagon só teve efeito no parâmetro de Cdyn enquanto a dose de 10 µg/Kg não apresentou nenhuma ação nem sobre RL nem sobre Cdyn(ver Figura 4.4). Uma justificativa para a ausência de efeito da dose de 10 µg/Kg do glucagon é a possibilidade do GcgR ter sido dessensibilizado nessa dose, pois o GcgR sofre internalização quando é estimulado de forma intensa pelo glucagon (140-142). Essas doses de glucagon foram escolhidas com base na clínica médica em que a dose aproximada utilizada para combater quadros de hipoglicemia grave é a de 10 µg/Kg por via i.v., s.c ou i.m. (145). Como no nosso trabalho o glucagon é administrado por via i.n. e assim alcança diretamente o seu local de ação, que no caso é o trato respiratório, nós resolvemos testar também as doses inferiores a de 10 µg/Kg.

O efeito do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida pela metacolina *in vivo* foi melhor evidenciado no parâmetro da Cdyn do que na RL(ver

Figura 4.4), o que sugere que o GcgR esteja situado principalmente nas regiões distais das vias aéreas. Baseamos essa hipótese no fato de que as vias aéreas centrais são as que mais contribuem para a RL (7, 16), enquanto que as vias aéreas periféricas são as que mais influenciam na Cdyn (184). Por fim, como a dose de 1 µg/Kg do glucagon foi capaz de exercer efeito em ambos os parâmetros da função pulmonar, escolhemos essa dose para ser administradas nos experimentos seguintes.

Na tentativa de esclarecer se os mecanismos moleculares atribuídos ao efeito anti-espasmódico do glucagon *in vitro* também são relevantes *in vivo*, nós administramos i.p. L-NAME ou SC-560 30 min antes do tratamento i.n. com glucagon. Notamos que ambos os inibidores bloquearam o efeito protetor do glucagon sobre o aumento de RL e redução de Cdyn causados pela metacolina (ver Figuras 4.5 e 4.6). Esses resultados confirmam a participação de NO e produtos de COX-1 na atividade anti-espasmódica do glucagon *in vivo*. Além disso, observamos que o glucagon promoveu fosforilação de CREB nos pulmões 15 e 30 min após a instilação (ver Figura 4.7A). Uma vez que a ativação de GcgR aumenta os níveis intracelulares de AMPc (132) e que o CREB é fosforilado em resposta a este segundo mensageiro (133, 185), esse resultado *in vivo* confirma os dados obtidos *in vitro* que demonstraram que a ação anti-espasmódica do glucagon depende do seu receptor e da ativação da AC.

Visto que as enzimas NOS-3 e COX-1 são expressas constitutivamente no epitélio respiratório (45, 53), e que também são sensíveis a uma regulação na sua expressão (186, 187), fomos avaliar a ativação e/ou expressão dessas enzimas após uma administração intranasal com glucagon em diferentes tempos (15; 30; 60; 120 e 180 min). O glucagon aumentou a ativação de NOS-3 e COX-1, que foi evidenciado pela elevação na fosforilação de NOS-3 e na produção de PGE₂ a partir do tempo de 30 até 180 min após a sua administração. Entretanto, o glucagon não aumentou a expressão de COX-1 (ver Figuras 4.7B, 4.7C e 4.7D). Esses resultados mostram que o glucagon ativa NOS-3 e COX-1 através da via do AMPc, já que como observado anteriormente, a fosforilação de CREB ocorreu antes da ativação dessas enzimas. Além disso, também é descrito na literatura que o AMPc é capaz de estimular NOS e COX (188-190). No nosso estudo, tanto a fosforilação de NOS-3 quanto a produção de PGE₂ ocorreram a partir de 30 até 180 min após a instilação com glucagon, o que sugere que o NO e a PGE₂ estejam atuando de forma sinérgica. A presença desses 2 fatores pró-relaxantes durante todo esse tempo nos pulmões pode explicar porque o efeito do glucagon sobre a

contração do músculo liso das vias aéreas provocada pela metacolina é melhor evidenciado 3 h após sua administração.

Após termos caracterizado o efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração do músculo liso das vias aéreas *in vitro* e *in vivo* fomos investigar o efeito do glucagon num contexto de inflamação pulmonar *in vivo*. Para isso, utilizamos dois modelos murinos de resposta inflamatória do tecido pulmonar, sendo um deles constituído por uma única estimulação i.n. com LPS e, o outro modelo composto por um desafio i.n. ao dia com OVA durante 2 dias consecutivos em camundongos A/J previamente sensibilizados s.c. com OVA. Nossos resultados mostraram que a instilação com LPS promoveu hiper-reatividade das vias aéreas que foi determinada pela exacerbação das mudanças na RL e Cdyn desencadeadas pelos aerossóis de metacolina. Também foi notada uma intensa infiltração leucocitária que foi acompanhada por um acúmulo de células mononucleares e neutrófilos e por um aumento nos níveis de TNF- α no BAL (ver Figura 4.8). O modelo de inflamação induzida por LPS é muito utilizado como ponto inicial para investigar a ação de diversas substâncias em doenças respiratórias como LPA/SDRA. O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. Ele ativa receptores *toll-like* 4 e dessa forma desencadeia uma resposta inflamatória local. O LPS administrado por via intranasal ou intratraqueal induz um processo inflamatório pulmonar com um acúmulo de células nos pulmões, principalmente de neutrófilos, bem como promove hiper-reatividade das vias aéreas, extravasamento de conteúdo proteico no espaço alveolar em consequência do dano ao epitélio e alterações morfológicas do parênquima pulmonar similares as observadas em pacientes com LPA/SDRA (191-193). Além disso, a resposta inflamatória induzida pelo LPS é caracterizada por grande ativação da enzima NOS-2 e produção de altos níveis de NO (194).

O tratamento i.n.com glucagon impediu a hiper-reatividade das vias aéreas, o acúmulo de leucócitos e neutrófilos e a produção de TNF- α no BAL (ver Figura 4.8), o que permite sugerir que esse hormônio também possui propriedades anti-inflamatórias e que seu efeito anti-espasmódico sobre a contração do músculo liso das vias aéreas é mantido mesmo na presença de sinais pró-inflamatórias e da superprodução de NO. Uma possível explicação para a ação anti-inflamatória do glucagon no modelo de LPA/SDRA causada por LPS, é que esse hormônio pode estar promovendo um aumento de AMPc em algumas células inflamatórias e dessa forma estaria inibindo a ativação e recrutamento dessas células para o tecido pulmonar (135-137).

Devido a importância dos neutrófilos na fisiopatologia da LPA/SDRA, fomos avaliar se essas células poderiam ser alvo direto do efeito anti-inflamatório do glucagon observado no modelo de LPA/SDRA induzida pelo LPS. Para isso, PMNs do sangue periférico de seres humanos foram isolados. Amostras de sangue humano foram utilizadas porque nos fornecem um maior número de células PMNs do que as amostras de camundongos e porque trabalhar com amostras humanas tem uma relevância maior. Primeiro avaliamos a presença do GcgR nas células PMNs humanas e constatamos que essas células expressam esse receptor (ver Figura 4.9B), o que torna possível que o glucagon exerça alguma ação direta sobre os PMNs. Os PMNs são constituídos por neutrófilos, eosinófilos e basófilos e a principal característica é a presença de grânulos no citoplasma (195). Em humanos, os neutrófilos representam 60% dos leucócitos circulantes e 90% dos PMNs (196), por isso podemos considerar que as células utilizadas nesse experimento foram basicamente neutrófilos. Testamos o efeito do glucagon sobre a quimiotaxia de PMNs *in vitro* já que o recrutamento excessivo de neutrófilos para os pulmões é uma das principais marcas da resposta inflamatória na LPA/SDRA (66). A IL-8 estimulou a quimiotaxia dos PMNs *in vitro* (ver Figura 4.9C), o que já era esperado, pois a IL-8 é uma das quimiocinas mais importantes para a migração de neutrófilos humanos para os pulmões (80). Todas as concentrações de glucagon inibiram a quimiotaxia dos PMNs induzida por IL-8 *in vitro* sem alterarem a viabilidade dessas células (ver Figuras 4.9C e 4.9D), o que mostra que o glucagon não induziu morte celular para exercer esse efeito inibitório. Acreditamos que a elevação dos níveis de AMPc nos PMNs possa ser um dos mecanismos pelo qual o glucagon impede a migração dessas células induzida pela IL-8 *in vitro*, uma vez que o glucagon é capaz de aumentar a concentração de AMPc nos PMNs (197) e o AMPc suprime várias funções dos neutrófilos, incluindo desgranulação, produção de superóxido e quimiotaxia induzida por quimiocinas (198). Inclusive, já foi demonstrada uma redução na geração de superóxido pelos PMNs induzida pelo glucagon (149). O rolipram é um fármaco que aumenta as concentrações intracelulares de AMPc através da inibição da fosfodiesterase-4, que é uma enzima que degrada o AMPc (199). Nós escolhemos o rolipram, e não algum glicocorticóide como nosso controle positivo de inibição da quimiotaxia de PMNs *in vitro*, porque é descrito na literatura que os neutrófilos são menos responsivos aos glicocorticóides, uma vez que alguns eventos relacionados com a ativação dessas células, como adesão, quimiotaxia, degranulação e liberação de metabólitos do ácido araquidônico não são inibidos de forma eficaz pelos glicocorticóides (200). Além disso, o mecanismo pelo qual

o rolipram inibe a migração dos neutrófilos está relacionado com o aumento de AMPc (198, 201, 202), que é a forma pela qual sugerimos que o glucagon também esteja atuando.

Nós não descartamos a possibilidade de que, como observado para a ação anti-espasmódica do glucagon, que o efeito anti-inflamatório do glucagon no modelo de LPA/SDRA também possa estar associado com a geração de NO e prostaglandinas. A PGE₂ pode prevenir a inflamação das vias aéreas na LPA/SDRA através da inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos e do bloqueio do recrutamento de neutrófilos para os pulmões (203). Além disso, o NO derivado da enzima NOS-3 tem sido associado com o bloqueio da inflamação das vias aéreas através da inibição da expressão de NOS-2, da redução da produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , e da indução para fenótipo M2 dos macrófagos (204-207).

Sabendo que o glucagon atua sobre o epitélio para produzir seu efeito anti-espasmódico sobre a contração do músculo liso das vias aéreas e que a célula epitelial pulmonar é um elemento central na fisiopatologia e resolução da LPA/SDRA, pois regula o conteúdo de água e soluto do fluido que reveste o epitélio e é capaz de produzir diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (208, 209), fomos avaliar a ação do glucagon sobre a secreção da quimiocina IL-8 pela célula epitelial. Em humanos, o epitélio das vias aéreas é uma das principais fontes de IL-8 (210) e, os níveis dessa quimiocina estão aumentados no BAL de pacientes com LPA/SDRA em comparação a indivíduos saudáveis. Além disso, pacientes com LPA/SDRA que possuem concentrações muito elevadas de IL-8 no BAL apresentam uma taxa de mortalidade maior do que os pacientes que possuem concentrações mais baixas de IL-8 (211). Nós trabalhamos com as células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549, porque essa linhagem celular é uma ferramenta bastante utilizada nos estudos sobre o epitélio das vias aéreas. O LPS promoveu aumento da produção de IL-8 pelas células A549 e a dexametasona reduziu essa produção, o que é um dado já existente na literatura (212). O glucagon em nenhuma das concentrações testadas exerceu algum efeito sobre a liberação de IL-8 pelas células A549 ativadas pelo LPS (ver Figura 4.10). Duas explicações podem ser dadas para esse resultado: i) o glucagon não é capaz de interferir na produção de citocinas e quimiocinas pelas células epiteliais; ii) a célula A549, por ser de uma linhagem de origem carcinogênica, apresenta alguma alteração na expressão ou funcionalidade do GcgR.

O outro modelo de inflamação pulmonar utilizado nesse trabalho foi um modelo de asma aguda de 2 dias consecutivos de desafio i.n. com OVA em camundongos A/J. Esse modelo de asma já é bem estabelecido no nosso laboratório e utiliza a linhagem A/J porque

esses camundongos apresentam uma boa produção de IgE e desenvolvem inflamação e remodelamento pulmonar após os desafios com OVA similares ao que acontece em pacientes asmáticos não-graves (163, 213, 214). Desde o início deste estudo já queríamos estudar se o glucagon apresentaria efeito anti-asmático, por isso trabalhamos com essa linhagem de camundongos ao longo de todo o projeto.

No nosso modelo de asma aguda ocorreu um aumento da expressão do GcgR nos pulmões e nas células do BAL e dos linfonodos mediastinais nos camundongos desafiados com OVA em relação aos apenas instilados com salina (ver Figuras 4.11 e 4.12). Dado semelhante existe na literatura para o receptor do glicocorticóide, em que os autores descreveram um aumento desse receptor após sensibilização e desafio de camundongos com extrato de *Aspergillus fumigatus*. Esse aumento da presença do GcgR pode estar relacionado com uma elevação no número de células inflamatórias nesses locais após o desafio com OVA, o que foi confirmado pelo maior número de: leucócitos totais, células mononucleares e eosinófilos no BAL (ver Figura 4.13), células mononucleares e eosinófilos no tecido pulmonar (ver Figura 4.14), células TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL e linfonodos mediastinais (ver Figura 4.18) e pelo aumento da expressão do TCRαβ nos pulmões (ver Figura 4.17) indicando um maior número de linfócitos T. Esse fenômeno relacionado ao GcgR sugere que as células inflamatórias possam ser alvo do glucagon no contexto da asma. De fato, o tratamento i.n. com glucagon, principalmente na dose de 100 µg/Kg, foi capaz de impedir todas essas alterações, exceto sobre o número de células mononucleares no BAL e no tecido pulmonar. Essas células monocleares que não foram afetadas pelo glucagon podem ser macrófagos alveolares ou linfócitos B, mas não linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺, pois como já apontado, o glucagon impediu o aumento no número desses linfócitos no BAL, linfonodos mediastinais e pulmões.

Apesar do glucagon não ter agido nas células mononucleares no BAL, ele foi capaz de prevenir o aumento no número de eosinófilos que são uma das células centrais na fisiopatologia da asma, uma vez que eles liberam diversos mediadores inflamatórios que causam dano tecidual e perpetuam a resposta inflamatória o que auxilia no desenvolvimento da hiper-reatividade e remodelamento das vias aéreas (91, 103, 104). Em seguida, fomos avaliar a população de eosinófilos no tecido pulmonar e para isso utilizamos duas metodologias. A primeira foi o ensaio da atividade da EPO que é uma peroxidase secretada pelos eosinófilos. O ensaio da EPO é um método simples e bastante utilizado para a quantificação de eosinófilos em amostras biológicas, pois existe uma boa correlação entre o

acúmulo de eosinófilos e o aumento da atividade da EPO em extratos de tecido pulmonar. Além disso, esse método permite a análise simultânea de um grande número de amostras (171, 173). O tratamento com glucagon nas duas doses utilizadas impediu o aumento da atividade da EPO no extrato pulmonar induzido pelo desafio com OVA (ver Figura 4.14A), o que indica um possível efeito do glucagon sobre os eosinófilos presentes no tecido pulmonar. Para confirmar esse dado e quantificar de forma direta a ação do glucagon sobre os eosinófilos aderidos aos pulmões, nós coramos com *Sirius Red* (ph = 10,2) secções histológicas do tecido pulmonar. O *Sirius red* marca os grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos com uma cor alaranjada e não cora o citoplasma dos neutrófilos, o que permite a contagem direta num microscópio óptico do número de eosinófilos e a distinção desses com os neutrófilos no tecido pulmonar. O tratamento com glucagon 1 h antes do desafio com OVA preveniu as alterações no número de eosinófilos no tecido pulmonar promovidas pela OVA (ver Figura 4.14B). Um dos efeitos conhecidos do aumento dos níveis intracelulares de AMPc nas vias aéreas é a redução do recrutamento e ativação de eosinófilos (135, 136). Dessa forma, é possível que caso os eosinófilos expressem o GcgR, o glucagon possa estar agindo diretamente sobre essas células, inibindo assim a eosinofilia característica desse modelo de asma aguda. Entretanto, essa hipótese ainda deve ser investigada. O glucagon também pode estar inibindo o acúmulo de eosinófilos nos pulmões de forma indireta, agindo sobre outras células e reduzindo a produção de quimiocinas que atraem eosinófilos, o que é corroborado pela redução nos níveis de Eot-1 e Eot-2 que ocorreu nos pulmões com a administração i.n. de glucagon no nosso modelo de asma aguda (ver Figura 4.15).

Para verificar se o glucagon poderia estar inibindo a produção de quimiocinas por outros tipos de células o que também contribuiria para a redução na quantidade de eosinófilos nos pulmões, fomos investigar se o glucagon seria capaz de impedir a secreção de Eot-2 pelas células A549 ativadas com IL-13 *in vitro*. O interesse em avaliar os níveis dessa eotaxina pode ser explicado pelo fato dela ser uma das principais responsáveis pelo recrutamento de eosinófilos para os pulmões na inflamação asmática. Também é descrito que o epitélio das vias aéreas é uma fonte importante de eotaxinas e que nos indivíduos asmáticos essa quimiocina é altamente expressa pelas células epiteliais do pulmão. Além disso, utilizamos a IL-13 como estímulo, pois alguns estudos sugerem que a IL-13 pode ser um indutor da produção de eotaxinas pelo epitélio das vias aéreas que pode contribuir para a eosinofilia pulmonar provocada pela IL-13 na resposta inflamatória asmática (215-217). A IL-13 promoveu uma elevação na produção de Eot-2 pelas células epiteliais alveolares humanas da

linhagem A549 e a dexametasona impediu essa ação da IL-13 (ver Figura 4.16). Outros trabalhos já haviam relatado a capacidade da dexametasona em reduzir a secreção de eotaxinas por células epiteliais estimuladas com TNF- α , IL-1 β ou IL-4 (218, 219). O glucagon novamente não exerceu nenhum efeito sobre as células A549 (ver Figura 4.16), o que pode significar, como já mencionado anteriormente, que a célula A549 talvez não expresse o GcgR e por isso o glucagon não produza nenhuma ação ou que o glucagon não consegue inibir a secreção de mediadores inflamatórios por qualquer célula epitelial.

Outro tipo de célula inflamatória que sofreu interferência do tratamento com glucagon no nosso modelo de asma aguda foram os linfócitos T. A maioria dos linfócitos T no sangue, sistema linfático e órgãos linfóides secundários expressam o TCR do tipo $\alpha\beta$ e também expressam as moléculas CD4 ou CD8 (220, 221). No nosso trabalho, a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ i.n. de glucagon impediu o aumento da expressão do TCR $\alpha\beta$ nos pulmões e do número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no BAL e linfonodos mediastinais dos camundongos desafiados com OVA (ver Figuras 4.17 e 4.18). Os linfonodos mediastinais se localizam no mediastino que é uma região na cavidade torácica situada entre os pulmões (222). Possivelmente o glucagon está reduzindo a população de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nos pulmões e BAL e por isso um número menor dessas células estão sendo drenadas para os linfonodos mediastinais. Mas também o glucagon pode estar diminuindo o número de células T ativadas nos linfonodos mediastinais e assim menos células T efetoras estariam disponíveis para serem recrutadas para os pulmões (223). Além disso, o glucagon pode estar atuando sobre os linfáticos, aumentando sua capacidade de drenagem o que estaria acelerando a resolução da resposta inflamatória local. Dentre os linfócitos TCD4⁺, o perfil Th2 é apontado como um dos mais presentes na resposta inflamatória da asma (99), por isso, apesar de não termos feito nenhuma marcação específica para as células Th2, acreditamos que boa parte do efeito do glucagon sobre os linfócitos T seja sobre o perfil Th2. Um resultado que sugere essa atuação sobre os linfócitos Th2 foi a redução dos níveis de IL-4 nos pulmões promovida pela administração i.n. do glucagon (ver Figura 4.15C), pois a IL-4 além de ser produzida por basófilos e macrófagos, é uma das principais citocinas liberadas pelos linfócitos Th2 (119). Em adição, a IL-4 está associada com a polarização de células Th0 em células Th2 (105).

Sabendo que já foi descrita a expressão do GcgR em linfócitos T (155), fomos avaliar como estariam os níveis desse receptor nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ no contexto da asma induzida por OVA e do tratamento com glucagon. Já no grupo salina observamos uma diferença na expressão do GcgR entre as células TCD4⁺ e TCD8⁺ em que tanto no BAL

quanto nos linfonodos mediastinais, as células TCD4⁺ possuem uma maior quantidade de GcgR do que os linfócitos TCD8⁺ (ver Figuras 4.19 e 4.20). No BAL, o desafio com OVA diminuiu a expressão do GcgR nas células TCD4⁺ e aumentou a quantidade desse receptor nas células TCD8⁺ (ver Figura 4.19). Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ desempenham funções diferentes na resposta inflamatória, enquanto os TCD4⁺ medeiam a resposta imune através da secreção de citocinas específicas e promovem a ativação das células do sistema imune inato, linfócitos B e células não imunes (224), os linfócitos TCD8⁺ causam citotoxicidade direta nas suas células-alvo que estão infectadas (225). Além disso, as células TCD4⁺ e TCD8⁺ respondem diferentemente à supressão pelas células T reguladoras e possuem diferentes requisitos de co-estimulação e fator de crescimento (226). Sendo assim, é aceitável que exista diferenças entre essas células quanto a expressão de moléculas tanto na homeostasia quanto após algum estímulo, como foi o caso do GcgR que já era expresso de forma distinta no grupo salina (que representa a homeostasia) e teve sua expressão alterada de forma diferente após o estímulo com OVA. Não sabemos esclarecer com certeza porque no BAL a OVA induziu redução na expressão do GcgR nos linfócitos TCD4⁺ e aumento nos TCD8⁺. Uma hipótese para a redução da expressão de GcgR em células TCD4⁺ seria uma modulação negativa induzida por citocinas pró-inflamatórias. A mesma explicação pode servir para o fato do tratamento do glucagon ter reestabelecido a expressão do GcgR apenas nas células TCD4⁺ mas não nas TCD8⁺ do BAL (ver Figura 4.19).

Nos linfonodos mediastinais, o desafio com OVA induziu o aumento na quantidade do GcgR nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ em comparação ao desafio com grupo salina (ver Figura 4.20). Também não sabemos justificar porque houve aumento no grupo OVA em relação ao grupo salina, mas ao compararmos a expressão do GcgR⁺ nos linfócitos TCD4⁺ do grupo OVA no BAL e nos linfonodos mediastinais, verificamos que é bem parecida. É possível que a maior parte das células TCD4⁺ nos linfonodos mediastinais sejam as que foram drenadas dos pulmões e mantiveram a mesma quantidade do GcgR durante o deslocamento até os linfonodos. Diferente do BAL, nos linfonodos mediastinais o tratamento do glucagon influenciou a expressão do GcgR nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ (ver Figura 4.20). Ainda estamos buscando explicações também para esse dado.

A partir dos resultados que mostraram um efeito inibitório do tratamento com glucagon sobre o número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ *in vivo* fomos avaliar se o glucagon seria capaz de exercer uma ação direta nos linfócitos T. Realizamos uma curva concentração-resposta (0,03 – 30µM) do glucagon *in vitro* e, observamos que esse hormônio inibiu a

proliferação de linfócitos T estimulados com anti-CD3 *in vitro* obtidos a partir de linfonodos de camundongos A/J. Essa inibição ocorreu de forma concentração-dependente, em que a concentração de 0,03 μM não exerceu efeito algum, e as concentrações de 3 e 30 μM apresentaram o mesmo perfil de resposta inibitória (ver Figura 4.21). Esse resultado vai de encontro ao trabalho publicado na literatura em que o glucagon não foi capaz de interferir na proliferação de linfócitos T estimulados com anti-CD3 *in vitro* (156). Apesar da concentração do anti-CD3 ter sido igual a que utilizamos, as concentrações de glucagon que eles testaram (0-100 nM) foram inferiores a nossa e talvez por isso os autores não tenham observado nenhum efeito do glucagon.

A partir dos nossos dados de proliferação, testamos a ação do glucagon nas concentrações de 0,03, 0,3 e 3 μM sobre a produção de IL-2, IL-17, IL-10, TNF- α e IFN- γ pelas células T (ver Figura 4.22). As citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ são secretadas por linfócitos de perfil Th1, a citocina IL-10 é produzida por linfócitos Th2 (227, 228) e a IL-17 por células Th17 (229, 230). Nós utilizamos o kit *CBA* (*BDBiosciences*) que num mesmo ensaio quantifica citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17 porque apesar da asma ser uma doença classicamente caracterizada pela predominância de linfócitos Th2 e consequentemente de citocinas de perfil Th2 nas vias aéreas (231), níveis elevados de IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-17 são encontrados em pacientes com asma crônica e estão associados com a gravidade da doença (229-233). Além disso, a IL-2 induz a proliferação de células T, estimula o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas (234) e junto com a IL-4 é capaz de induzir resistência do efeito dos glicocorticóides nos linfócitos T. A inalação de IL-2 pode induzir sintomas semelhantes ao da asma em humanos, bem como, pode agravar a inflamação pulmonar em modelo murino de asma (235).

O TNF- α é capaz de atuar diretamente sobre o músculo liso das vias aéreas em humanos e aumentar a resposta contrátil a diversos agentes espasmódicos, podendo então contribuir para hiper-reatividade das vias aéreas na asma. Essa citocina também pode amplificar a resposta inflamatória na asma através da ativação do fator de transcrição NF- κB que aumenta a expressão de diversos genes inflamatórios. Já foi descrito que o bloqueio de TNF- α é capaz de reduzir a hiper-reatividade das vias aéreas e melhorar a função pulmonar em pacientes com asma moderada ou grave (231). O IFN- γ é a principal citocina liberada por linfócitos Th1, e apesar de geralmente apresentar níveis reduzidos em pacientes com asma moderada, ele é encontrado em níveis elevados na asma severa (231). Além disso, já foi

observado que o bloqueio de IFN- γ com um anticorpo neutralizante suprime a hiperreatividade das vias aéreas em modelo murino de asma crônica (236).

Atualmente é reconhecido que as células Th17 também podem participar da resposta inflamatória na asma. Esses linfócitos liberam a IL-17 que estimula o recrutamento de neutrófilos para os pulmões. Como mencionado anteriormente, os níveis de IL-17 estão aumentados nos pulmões dos pacientes com asma grave, o que permite associar a presença de Th17, IL-17 e o aumento do número de neutrófilos nas vias aéreas à severidade da doença e à existência de asmáticos esteróide-resistentes nos quais os glicocorticoides não são eficazes em controlar a inflamação pulmonar (99).

No nosso estudo, observamos que somente a concentração de 3 μ M do glucagon foi capaz de reduzir a secreção de IL-2, IL-17, IL-10, TNF- α e IFN- γ pelos linfócitos T ativados com anti-CD3 *in vitro* (ver Figura 4.22). Apesar de não ser muito animador o fato do glucagon ter diminuído os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, acreditamos que esse dado possa sugerir que o glucagon não atue apenas em linfócitos Th1 e Th17 mas também em células Th2. Nesse experimento utilizando o kit CBA também tentamos avaliar o efeito do glucagon sobre a produção de IL-4 e IL-6 que são citocinas também de perfil Th2 (228) e participam da fisiopatologia da asma, uma vez que a IL-4 é importante para a diferenciação das células Th2, estimula a mudança de classe de imunoglobulinas para o isotipo IgE em linfócitos B e está envolvida na eosinofilia das vias aéreas (237). Já a IL-6 eleva a produção endógena de IL-4 pelas células TCD4⁺, o que promove a diferenciação em linfócitos Th2, e junto com o TGF- β , a IL-6 induz a diferenciação de células T em Th17 (238). Entretanto, no nosso ensaio não foi detectado sinal dessas citocinas e, portanto novas análises deverão ser realizadas.

O glucagon impediu a proliferação e secreção de citocinas pelos linfócitos T ativados com anti-CD3 *in vitro* sem alterar a viabilidade dessas células, o que mostra que essa ação inibitória do glucagon ocorreu sem que ele induzisse morte celular. Não sabemos precisar se foi a redução na proliferação dos linfócitos T pelo glucagon que causou a diminuição nos níveis de citocinas, pois com a inibição da proliferação um número menor de células estaria produzindo as citocinas, ou se os efeitos produzidos pelo glucagon ocorreram de forma independente.

Ainda estudando o efeito do glucagon sobre os linfócitos T, utilizamos também um protocolo em que linfócitos foram obtidos de linfonodos de camundongos transgênicos DO11.10 com TCR específico para OVA e foram ativados com OVA *in vitro*, a fim de

utilizarmos o mesmo estímulo empregado no modelo de asma aguda *in vivo* que foi a OVA. Nesse experimento, as concentrações de 1 e 3 μM de glucagon impediram o aumento da proliferação e do percentual de células TCD4^+ promovido pela OVA *in vitro* enquanto a concentração de 10 μM de glucagon reduziu apenas o percentual dos linfócitos TCD4^+ (ver Figura 4.23). Assim como no protocolo com anti-CD3, o glucagon não interferiu na viabilidade dessas células. Apesar da concentração de 10 μM de glucagon ter tido efeito sobre o percentual de células TCD4^+ talvez não tenha atuado sobre outros linfócitos e, por isso, essa concentração não apresentou efeito sobre a proliferação induzida por OVA *in vitro*. Essa hipótese deverá ser melhor investigada.

Na literatura já é relatado que um aumento nos níveis intracelulares de AMPc inibe a proliferação, produção de IL-2 e a atividade funcional das células T. Além disso, o AMPc também aumenta a expressão da molécula CTLA-4 e induz a anergia em células T em repouso (139). A partir disso, sugerimos que o efeito inibitório do glucagon sobre os linfócitos T estimulados com anti-CD3 ou OVA *in vitro* possa estar ocorrendo através do GcgR, visto que já descreveram tanto a expressão desse receptor em linfócitos quanto um aumento de AMPc produzido pelo glucagon nessas células (155, 156). Isso ainda será avaliado em experimentos futuros.

Além da resposta inflamatória, a hiper-reatividade das vias aéreas também é uma das principais características da asma (88). Nesse modelo utilizando a OVA como desencadeadora da resposta inflamatória, o tratamento i.n. com glucagon também impediu a hiper-reatividade das vias aéreas em resposta a aerossóis de metacolina tanto no parâmetro da RL quanto na Cdyn (ver Figura 4.24). A musculatura lisa das vias aéreas é uma das principais responsáveis pela contração e hiper-reatividade das vias aéreas na asma (34). Dessa forma, a ação anti-espasmódica do glucagon sobre o músculo liso que descrevemos nesse projeto pode estar levando a redução da hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina.

A inflamação também pode contribuir para a hiper-reatividade das vias aéreas. Em pacientes asmáticos, existe uma correlação positiva entre a gravidade da hiper-reatividade das vias aéreas e o número de eosinófilos e mastócitos nos pulmões (112). Algumas citocinas secretadas pelos linfócitos Th2, como a IL-13, também estão relacionadas com a ocorrência da hiper-reatividade das vias aéreas (105). Em trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que o glucagon reduz o número de mastócitos no peritônio e mesentério de camundongos (158). Talvez nesse projeto ele também possa estar diminuindo a quantidade de mastócitos nas vias aéreas. Além disso, como descrito acima, o glucagon reduziu o número de eosinófilos, de

linfócitos T nos pulmões, BAL e linfonodos mediastinais bem como inibiu a secreção de citocinas pelos linfócitos T *in vitro*. Todos esses efeitos do glucagon podem estar levando a uma menor hiper-reatividade das vias aéreas nos animais tratados com glucagon e desafiados com OVA.

A perpetuação da resposta inflamatória desencadeia o remodelamento das vias aéreas que são mudanças estruturais como hiperplasia das células de *globet*, fibrose subepitelial e hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa, entre outras, que acarretam no aumento da produção de muco, obstrução brônquica e sensação de falta de ar (91, 116). Por fim, fomos investigar o efeito do tratamento do glucagon sobre uma dessas alterações que foi a fibrose subepitelial. A quantificação digital dos componentes da MEC corados com Tricrômio de Masson mostrou que o desafio com OVA aumentou a deposição da MEC nas aéreas peribronquiolares, o que caracterizou uma fibrose subepitelial. O tratamento com glucagon na dose de 100 µg/Kg, i.n. impediu esse aumento da deposição, ou seja, preveniu a fibrose subepitelial (ver Figura 4.25). Sabendo que os fibroblastos são os principais responsáveis pela deposição de MEC (111) e, que a proliferação e ativação de fibroblastos pulmonares no foco da lesão inflamatória são fenômenos importantes associados com a perpetuação da inflamação crônica da asma e com o remodelamento das vias aéreas observado em asmáticos (106), fomos avaliar a ação do glucagon sobre a resposta proliferativa de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos A/J e estimulados com IL-13 *in vitro*. O glucagon (0,1 - 10 µM) *in vitro* não exerceu nenhum efeito sobre a proliferação de fibroblastos em nenhuma das concentrações avaliadas (ver Figura 4.26). Esperávamos que o glucagon fosse capaz de inibir a proliferação desses fibroblastos, uma vez que o aumento nos níveis de AMPc reduz a resposta proliferativa e ativação dessas células (239). Dessa forma, sugerimos que ou o glucagon pode impedir diretamente a secreção da MEC pelos fibroblastos pulmonares sem alterar a proliferação ou talvez esses fibroblastos não expressam o GcgR de forma significativa e por isso o glucagon não seria capaz de exercer nenhum efeito direto sobre essas células. Essas hipóteses também serão melhores avaliadas em experimentos futuros.

A partir desse resultado *in vitro* consideramos que é possível o glucagon reduza a fibrose subepitelial nos pulmões agindo de forma indireta sobre os fibroblastos. Nós observamos que o glucagon aumenta os níveis de PGE₂ nos pulmões e alguns estudos mostram que a PGE₂ inibe a proliferação, produção de colágeno e diferenciação em miofibroblastos dos fibroblastos pulmonares (240). Além disso, os efeitos do glucagon que descrevemos para os linfócitos T podem estar levando a uma redução na secreção de IL-13

por esses linfócitos. A IL-13 é uma citocina que está envolvida no desencadeamento da fibrose subepitelial, pois essa citocina estimula a proliferação e produção de TGF- β e de colágeno pelos fibroblastos e também induz a diferenciação em miofibroblastos (111).

Dessa forma, podemos sugerir que o glucagon além de possuir uma ação anti-espasmódica sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas induzida por agentes colinérgicos *in vitro* e *in vivo* também impede a hiper-reatividade das vias aéreas em resposta a metacolina, apresenta ação anti-inflamatória nos modelos murinos de LPA/SDRA e asma aguda e previne o remodelamento das vias aéreas característico da asma.

6. Conclusão

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o glucagon impede a contração do músculo liso causada por agente colinérgico e reduz a resposta inflamatória e hiperreatividade das vias aéreas induzidas pelo LPS e OVA em modelos murino de LPA/SDRA e asma, respectivamente. O efeito anti-espasmódico do glucagon está associado ao aumento da ativação da NOS-3 e COX-1, com conseqüente produção de NO e PGE₂ pelas células epiteliais. Já a ação anti-inflamatória parece estar relacionada com a redução da quimiotaxia e recrutamento de neutrófilos no modelo de LPA/SDRA e com a diminuição do recrutamento de eosinófilos e linfócitos T e da inibição da função das células T no modelo de asma aguda (Figura 6.1). Esses dados sugerem que o glucagon pode ser um possível candidato a protótipo para novos tratamentos de doenças inflamatórias pulmonares como LPA/SDRA e asma.

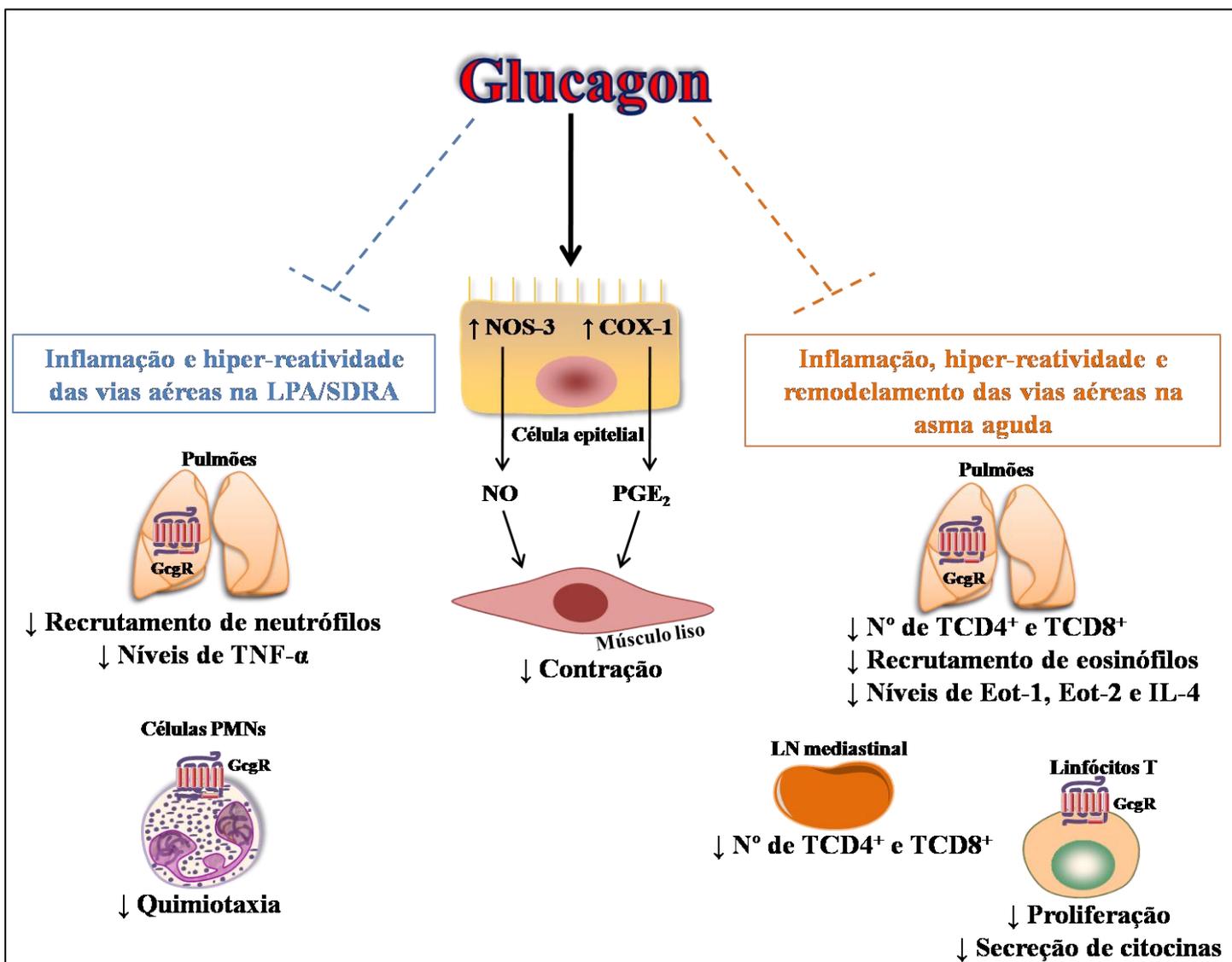


Figura 6.1. Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito anti-espasmódico do glucagon sobre a contração da musculatura lisa das vias aéreas e na ação anti-inflamatória do glucagon nos modelos murino de LPA/SDRA e asma. O glucagon atua sobre as células epiteliais das vias aéreas ativando NOS-3 e COX-1. A ativação de NOS-3 culmina na produção e liberação NO, e a ativação de COX-1 leva a síntese e secreção de PGE₂ pela célula epitelial. Esses dois fatores atuam de forma sinérgica sobre a célula muscular lisa e inibem a contração induzida por agonistas colinérgicos. Além disso, o glucagon impede a inflamação e hiper-reatividade das vias aéreas no modelo de LPA/SDRA possivelmente através da redução: dos níveis de TNF- α no tecido pulmonar, do recrutamento de neutrófilos para os pulmões e da quimiotaxia de PMNs *in vitro*. O glucagon também impede a resposta inflamatória, hiper-reatividade e remodelamento da vias aéreas no modelo de asma aguda ao diminuir: o recrutamento de eosinófilos e linfócitos T para os pulmões, os níveis de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões, o número de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nas vias aéreas e linfonodos mediastinais e a proliferação e secreção de citocinas por linfócitos T *in vitro*. Eot-1 = Eotaxina-1. Eot-2 = Eotaxina-2. GcgR= Rceptor do glucagon. IL-4 = Interleucina-4. LN= Linfonodo. NO = Óxido nítrico. PGE₂ = Prostagladina E₂. PMN = Pomimorfonuclear.

7. Referências Bibliográficas

1. Raff H, Levitzky MG. Fisiologia Médica - 1ed: McGraw Hill Brasil; 2012.
2. Ovalle W, Nahirney PC. Netter Bases da Histologia: Elsevier Brasil; 2014.
3. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian journal of anaesthesia*. 2015;59(9):533-41.
4. Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Disease models & mechanisms*. 2010;3(9-10):545-56.
5. Sato S, Bartolak-Suki E, Parameswaran H, Hamakawa H, Suki B. Scale dependence of structure-function relationship in the emphysematous mouse lung. *Frontiers in physiology*. 2015;6:146.
6. Irvin CG, Bates JH. Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respiratory research*. 2003;4:4.
7. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;124(6 Suppl):S72-7.
8. Rydell-Tormanen K, Risse PA, Kanabar V, Bagchi R, Czubryt MP, Johnson JR. Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: Airways and arteries. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2013;26(1):13-23.
9. Hamid Q, Tulic MK. New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Annals of thoracic medicine*. 2007;2(1):28-33.
10. Davies J. *Replacing Animal Models: A Practical Guide to Creating and Using Culture-based Biomimetic Alternatives*: Wiley; 2012.
11. Parent RA. *Comparative Biology of the Normal Lung*: Elsevier Science; 2015.
12. Hussain M, Madl P, Khan A. Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases, Part-I. *Health*. 2011;2(2):51-9.
13. Hill J, Olson E. *Muscle 2-Volume Set: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*: Elsevier Science; 2012.
14. Dixon RE, Santana LF. A Ca²⁺- and PKC-driven regulatory network in airway smooth muscle. *The Journal of general physiology*. 2013;141(2):161-4.
15. Glaab T, Taube C, Braun A, Mitzner W. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respiratory research*. 2007;8:63.
16. Jindal SK. *Textbook of Pulmonary and Critical Care Medicine (2 Vol)*: Jaypee Brothers, Medical Publishers; 2011.
17. Zin WA. Métodos e técnicas para a monitorização das propriedades elásticas e resistivas dos pulmões e da parede torácica na insuficiência respiratória aguda. *Jornal de Pneumologia*. 1990;16(2):91-6.
18. McNulty W, Usmani OS. Techniques of assessing small airways dysfunction. *European clinical respiratory journal*. 2014;1.
19. Johnson JR, Hamid Q. Appraising the small airways in asthma. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2012;18(1):23-8.
20. Schulte CDMPM. *Principios de Fisiologia Animal*: Artmed Editora; 2009.
21. Kelly VJ, Brown NJ, King GG, Thompson BR. A method to determine in vivo, specific airway compliance, in humans. *Medical & biological engineering & computing*. 2010;48(5):489-96.
22. Chitano P. Models to understand contractile function in the airways. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2011;24(5):444-51.
23. Doeing DC, Solway J. *Airway Smooth Muscle in the Pathophysiology and Treatment of Asthma*. *J Appl Physiol*. 2013.

24. Kistemaker LE, Oenema TA, Meurs H, Gosens R. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. *Life sciences*. 2012;91(21-22):1126-33.
25. Kolahian S, Gosens R. Cholinergic regulation of airway inflammation and remodelling. *Journal of allergy*. 2012;2012:681258.
26. Meurs H, Dekkers BG, Maarsingh H, Halayko AJ, Zaagsma J, Gosens R. Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: Novel findings for an ancient target. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2013;26(1):145-55.
27. Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*. 2008;154(8):1558-71.
28. Avellar MC, Siu ER, Yasuhara F, Marostica E, Porto CS. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the male reproductive tract: expression and function in rat efferent ductules and epididymis. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2010;40(1-2):127-34.
29. Jakubik J, Michal P, Machova E, Dolezal V. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2008;57 Suppl 3:S39-47.
30. Wu J, Lukas RJ. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(8):800-7.
31. Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;296(2):C221-32.
32. Ouedraogo N, Roux E. Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. *Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine*. 2014;4:1-6.
33. Sanderson MJ, Delmotte P, Bai Y, Perez-Zogbhi JF. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(1):23-31.
34. Black JL, Panettieri RA, Jr., Banerjee A, Berger P. Airway smooth muscle in asthma: just a target for bronchodilation? *Clinics in chest medicine*. 2012;33(3):543-58.
35. Barnes PJ. Pharmacology of airway smooth muscle. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(5 Pt 3):S123-32.
36. de Sousa AA, Soares PM, de Almeida AN, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AM. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;130(2):433-6.
37. Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2013;26(1):112-20.
38. Hoetzel A, Dolinay T, Vallbracht S, Zhang Y, Kim HP, Ifedigbo E, et al. Carbon monoxide protects against ventilator-induced lung injury via PPAR-gamma and inhibition of Egr-1. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(11):1223-32.
39. Michel MC, Parra S. Similarities and differences in the autonomic control of airway and urinary bladder smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;378(2):217-24.
40. Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. Beta-Adrenergic Agonists. *Pharmaceuticals*. 2010;3(4):1016-44.
41. Tanaka Y, Yamashita Y, Michikawa H, Horinouchi T, Koike K. Pharmacological characterization of the beta-adrenoceptor that mediates the relaxant response to noradrenaline in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2007;375(1):51-64.
42. Ruan YC, Zhou W, Chan HC. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(3):156-70.

43. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Experimental physiology*. 2008;93(1):141-7.
44. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International journal of cell biology*. 2010;2010:215158.
45. Konstantinidou M, Gkermani A, Hadjipavlou-Litina D. Synthesis and Pharmacochimistry of New Pleiotropic Pyrrolyl Derivatives. *Molecules*. 2015;20(9):16354-74.
46. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):986-1000.
47. Botting R, Botting J. C14 Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: Nijkamp FP, Parnham MJ, editors. *Principles of Immunopharmacology*: Birkhäuser Basel; 2011. p. 573-84.
48. Kam P, So A. COX-3: Uncertainties and controversies. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2009;20(1):50-3.
49. Liao MH, Shih CC, Tsao CM, Chen SJ, Wu CC. RhoA/Rho-Kinase and Nitric Oxide in Vascular Reactivity in Rats with Endotoxaemia. *PloS one*. 2013;8(2):e56331.
50. Aso H, Ito S, Mori A, Suganuma N, Morioka M, Takahara N, et al. Differential regulation of airway smooth muscle cell migration by e-prostanoid receptor subtypes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;48(3):322-9.
51. Nagai H. Prostaglandin as a target molecule for pharmacotherapy of allergic inflammatory diseases. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2008;57(3):187-96.
52. Ghosh S, Erzurum SC. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1810(11):1008-16.
53. Strapkova A, Antosova M. Competition of NO synthases and arginase in the airways hyperreactivity. *General physiology and biophysics*. 2011;30(1):75-83.
54. Perez-Zoghbi JF, Bai Y, Sanderson MJ. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca²⁺ oscillations. *The Journal of general physiology*. 2010;135(3):247-59.
55. Zieba BJ, Artamonov MV, Jin L, Momotani K, Ho R, Franke AS, et al. The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(19):16681-92.
56. Roscioni SS, Maarsingh H, Elzinga CR, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, et al. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(7):1551-63.
57. Bazan-Perkins B. cGMP reduces the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ loading in airway smooth muscle cells: a putative mechanism in the regulation of Ca²⁺ by cGMP. *Journal of muscle research and cell motility*. 2012;32(6):375-82.
58. Morgan SJ, Deshpande DA, Tiegs BC, Misiorek AM, Yan H, Hershfeld AV, et al. beta-Agonist-mediated relaxation of airway smooth muscle is protein kinase A-dependent. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(33):23065-74.
59. de Sousa CA. *Exercício físico para pessoas com doenças pulmonares*: Phorte Editora; 2011.
60. Bousquet J, Khaltsev NG, Cruz AA, Organization WH. *Global Surveillance, Prevention and Control of Chronic Respiratory Diseases: A Comprehensive Approach*: World Health Organization; 2007.
61. Kumar V, Aster JC, Abbas A. *Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças*: Elsevier Brasil; 2015.

62. DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*: McGraw-Hill Education; 2008.
63. Murray MJ, Rose SH, Wedel DJ, Wass CT, Harrison BA, Mueller JT. *Faust's Anesthesiology Review E-Book*: Expert Consult: Elsevier Health Sciences; 2014.
64. Campanholle G, Landgraf RG, Borducchi E, Semedo P, Wang PH, Amano MT, et al. Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *European journal of pharmacology*. 2010;634(1-3):132-7.
65. Causton B, Ramadas RA, Cho JL, Jones K, Pardo-Saganta A, Rajagopal J, et al. CARMA3 Is Critical for the Initiation of Allergic Airway Inflammation. *J Immunol*. 2015;195(2):683-94.
66. Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgraduate medical journal*. 2011;87(1031):612-22.
67. Pawankar R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *The World Allergy Organization journal*. 2014;7(1):12.
68. Schmickl CN, Pannu S, Al-Qadi MO, Alsara A, Kashyap R, Dhokarh R, et al. Decision support tool for differential diagnosis of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) vs Cardiogenic Pulmonary Edema (CPE): a prospective validation and meta-analysis. *Crit Care*. 2014;18(6):659.
69. Liu H, Yu X, Yu S, Kou J. Molecular mechanisms in lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial barrier dysfunction. *International immunopharmacology*. 2015;29(2):937-46.
70. Raghavendran K, Napolitano LM. ALI and ARDS: challenges and advances. *Critical care clinics*. 2011;27(3):xiii-xiv.
71. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *Journal of thoracic disease*. 2013;5(3):326-34.
72. Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*. 2010;23(4):243-52.
73. Shortt K, Chaudhary S, Grigoryev D, Heruth DP, Venkitachalam L, Zhang LQ, et al. Identification of novel single nucleotide polymorphisms associated with acute respiratory distress syndrome by exome-seq. *PloS one*. 2014;9(11):e111953.
74. Ochiai R. Mechanical ventilation of acute respiratory distress syndrome. *Journal of intensive care*. 2015;3(1):25.
75. Silva d, Hetzel JL, Felicetti JC, Moreira JdS, Camargo JJ, Nelson Porto LCC. *Pneumologia: Princípios e Prática*: Artmed Editora; 2009.
76. Fialkow L, Vieira SR, Fernandes AK, Silva DR, Bozzetti MC. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome at the intensive care unit of a general university hospital in Brazil. An epidemiological study using the American-European Consensus Criteria. *Intensive care medicine*. 2002;28(11):1644-8.
77. Umbrello M, Formenti P, Bolgiaghi L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *International journal of molecular sciences*. 2016;18(1).
78. Laffey JG, Matthay MA. Fifty Years of Research in ARDS. *Cell Based Therapy for ARDS: Biology and Potential Therapeutic Value*. American journal of respiratory and critical care medicine. 2017.
79. Proudfoot AG, McAuley DF, Griffiths MJ, Hind M. Human models of acute lung injury. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(2):145-53.
80. Cheng OZ, Palaniyar N. NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Frontiers in immunology*. 2013;4:1.

81. Xu Y, Meng C, Liu G, Yang D, Fu L, Zhang M, et al. Classically Activated Macrophages Protect against Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury by Expressing Amphiregulin in Mice. *Anesthesiology*. 2016;124(5):1086-99.
82. Cross LJ, Matthay MA. Biomarkers in acute lung injury: insights into the pathogenesis of acute lung injury. *Critical care clinics*. 2011;27(2):355-77.
83. Yan C, Guan F, Shen Y, Tang H, Yuan D, Gao H, et al. Bigelovii A Protects against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Blocking NF-kappaB and CCAAT/Enhancer-Binding Protein delta Pathways. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:9201604.
84. Vergadi E, Vaporidi K, Theodorakis EE, Doxaki C, Lagoudaki E, Ieronymaki E, et al. Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative macrophage activation and miR-146a induction in mice. *J Immunol*. 2014;192(1):394-406.
85. Johnston LK, Rims CR, Gill SE, McGuire JK, Manicone AM. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;47(4):417-26.
86. Kambara K, Ohashi W, Tomita K, Takashina M, Fujisaka S, Hayashi R, et al. In vivo depletion of CD206+ M2 macrophages exaggerates lung injury in endotoxemic mice. *The American journal of pathology*. 2015;185(1):162-71.
87. Aikawa N, Kawasaki Y. Clinical utility of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Therapeutics and clinical risk management*. 2014;10:621-9.
88. Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, et al. Identification of an IFN-gamma/mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(8):3133-43.
89. Patella V, Bocchino M, Steinhilber G. Asthma is associated with increased susceptibility to infection. *Minerva medica*. 2015;106(4 Suppl 3):1-7.
90. Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H. Pharmacogenetics of asthma in children. *Allergy, asthma & immunology research*. 2010;2(1):14-9.
91. Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and tissue research*. 2017;367(3):551-69.
92. Sulaiman I, Lim JC, Soo HL, Stanslas J. Molecularly targeted therapies for asthma: Current development, challenges and potential clinical translation. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2016;40:52-68.
93. D'Amato G, Vitale C, Molino A, Stanziola A, Sanduzzi A, Vatrella A, et al. Asthma-related deaths. *Multidisciplinary respiratory medicine*. 2016;11:37.
94. de Farias MR, Rosa AM, Hacon Sde S, de Castro HA, Ignotti E. Prevalence of asthma in schoolchildren in Alta Floresta- a municipality in the southeast of the Brazilian Amazon. *Rev Bras Epidemiol*. 2010;13(1):49-57.
95. Fiori NS, Goncalves H, Dumith SC, Cesar MA, Menezes AM, Macedo SE. Ten-year trends in prevalence of asthma in adults in southern Brazil: comparison of two population-based studies. *Cad Saude Publica*. 2012;28(1):135-44.
96. Nunes C, Pereira AM, Morais-Almeida M. Asthma costs and social impact. *Asthma research and practice*. 2017;3:1.
97. Brasil. Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros. <http://www.blog.saude.gov.br/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros.html>; Ministerio da Saúde2015.
98. Robinson D, Humbert M, Buhl R, Cruz AA, Inoue H, Korom S, et al. Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2017;47(2):161-75.

99. Vock C, Hauber HP, Wegmann M. The other T helper cells in asthma pathogenesis. *Journal of allergy*. 2010;2010:519298.
100. Ishmael FT. The inflammatory response in the pathogenesis of asthma. *The Journal of the American Osteopathic Association*. 2011;111(11 Suppl 7):S11-7.
101. Bradding P, Arthur G. Mast cells in asthma--state of the art. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2016;46(2):194-263.
102. Reuter S, Stassen M, Taube C. Mast cells in allergic asthma and beyond. *Yonsei medical journal*. 2010;51(6):797-807.
103. Varricchi G, Senna G, Loffredo S, Bagnasco D, Ferrando M, Canonica GW. Reslizumab and Eosinophilic Asthma: One Step Closer to Precision Medicine? *Frontiers in immunology*. 2017;8:242.
104. Wegmann M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(4):667-74.
105. de Groot JC, Ten Brinke A, Bel EH. Management of the patient with eosinophilic asthma: a new era begins. *ERJ open research*. 2015;1(1).
106. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews*. 2011;242(1):31-50.
107. Bonsignore MR, Profita M, Gagliardo R, Riccobono L, Chiappara G, Pace E, et al. Advances in asthma pathophysiology: stepping forward from the Maurizio Vignola experience. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2015;24(135):30-9.
108. Khan MA. Inflammation signals airway smooth muscle cell proliferation in asthma pathogenesis. *Multidisciplinary respiratory medicine*. 2013;8(1):11.
109. Damera G, Panettieri RA, Jr. Does airway smooth muscle express an inflammatory phenotype in asthma? *British journal of pharmacology*. 2011;163(1):68-80.
110. Ozier A, Allard B, Bara I, Girodet PO, Trian T, Marthan R, et al. The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology. *Journal of allergy*. 2011;2011:742710.
111. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:123.
112. Chapman DG, Irvin CG. Mechanisms of airway hyper-responsiveness in asthma: the past, present and yet to come. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(4):706-19.
113. Brannan JD, Loughheed MD. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Frontiers in physiology*. 2012;3:460.
114. Busse WW. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*. 2010;138(2 Suppl):4S-10S.
115. Hirota JA, Nguyen TT, Schaafsma D, Sharma P, Tran T. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2009;22(5):370-8.
116. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Canadian respiratory journal*. 2010;17(4):e85-93.
117. Barnes PJ. Biochemical basis of asthma therapy. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(38):32899-905.
118. Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, et al. beta2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(4):353-61.
119. Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(1):57-65.

120. Sekar R, Wang L, Chow BK. Central Control of Feeding Behavior by the Secretin, PACAP, and Glucagon Family of Peptides. *Frontiers in endocrinology*. 2017;8:18.
121. Cardoso JC, Vieira FA, Gomes AS, Power DM. The serendipitous origin of chordate secretin peptide family members. *BMC evolutionary biology*. 2010;10:135.
122. Watkins HA, Au M, Hay DL. The structure of secretin family GPCR peptide ligands: implications for receptor pharmacology and drug development. *Drug discovery today*. 2012;17(17-18):1006-14.
123. Pujadas G, Drucker DJ. Vascular Biology of Glucagon Receptor Superfamily Peptides: Mechanistic and Clinical Relevance. *Endocrine reviews*. 2016;37(6):554-83.
124. Campbell JE, Drucker DJ. Islet alpha cells and glucagon--critical regulators of energy homeostasis. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(6):329-38.
125. Briant L, Salehi A, Vergari E, Zhang Q, Rorsman P. Glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Upsala journal of medical sciences*. 2016;121(2):113-9.
126. Leibiger B, Moede T, Muhandiramlage TP, Kaiser D, Vaca Sanchez P, Leibiger IB, et al. Glucagon regulates its own synthesis by autocrine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(51):20925-30.
127. Wewer Albrechtsen NJ, Kuhre RE, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ. The biology of glucagon and the consequences of hyperglucagonemia. *Biomarkers in medicine*. 2016;10(11):1141-51.
128. Godoy-Matos AF. The role of glucagon on type 2 diabetes at a glance. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2014;6(1):91.
129. Vuguin PM, Charron MJ. Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011;13 Suppl 1:144-50.
130. Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(4):E751-61.
131. Authier F, Desbuquois B. Glucagon receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(12):1880-99.
132. Ahren B. Glucagon--Early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides*. 2015;67:74-81.
133. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2008;40(7):651-62.
134. Insel PA, Murray F, Yokoyama U, Romano S, Yun H, Brown L, et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *British journal of pharmacology*. 2012;166(2):447-56.
135. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Discovery medicine*. 2004;4(24):421-6.
136. Jin SL, Goya S, Nakae S, Wang D, Bruss M, Hou C, et al. Phosphodiesterase 4B is essential for T(H)2-cell function and development of airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;126(6):1252-9 e12.
137. Wyatt TA, Poole JA, Nordgren TM, DeVasure JM, Heires AJ, Bailey KL, et al. cAMP-dependent protein kinase activation decreases cytokine release in bronchial epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;307(8):L643-51.
138. Sarkar A, Sreenivasan Y, Manna SK. alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces cell death in mast cells: involvement of NF-kappaB. *FEBS Lett*. 2003;549(1-3):87-93.
139. Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM, Martins MA. Two for one: cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *European journal of pharmacology*. 2012;680(1-3):102-7.

140. Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, Unson CG, Williams R, Lee NH, et al. Dual mode of glucagon receptor internalization: role of PKC α , GRKs and beta-arrestins. *Experimental cell research*. 2011;317(20):2981-94.
141. Han J, Zhang M, Froese S, Dai FF, Robitaille M, Bhattacharjee A, et al. The Identification of Novel Protein-Protein Interactions in Liver that Affect Glucagon Receptor Activity. *PloS one*. 2015;10(6):e0129226.
142. Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, Unson CG, Bouscarel B. Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;295(5):C1230-7.
143. Fontes G, Lajoix AD, Bergeron F, Cadel S, Prat A, Foulon T, et al. Miniglucagon (MG)-generating endopeptidase, which processes glucagon into MG, is composed of N-arginine dibasic convertase and aminopeptidase B. *Endocrinology*. 2005;146(2):702-12.
144. Kieffer TJ, Hussain MA, Habener JF. Glucagon and Glucagon-like Peptide Production and Degradation. *Comprehensive Physiology: John Wiley & Sons, Inc.*; 2010.
145. Aswar M, Aswar U, Subhedar N. Glucagon Secreting Cells Responds to Insulin Secretion In vitro Using Immunocytochemistry. *Journal of young pharmacists : JYP*. 2010;2(2):144-7.
146. Ahonen A, Sovijarvi AR, Muittari A. Plasma glucagon response during exercise-induced asthma. *European journal of respiratory diseases*. 1983;64(3):166-71.
147. Heuer JG, Bailey DL, Sharma GR, Zhang T, Ding C, Ford A, et al. Cecal ligation and puncture with total parenteral nutrition: a clinically relevant model of the metabolic, hormonal, and inflammatory dysfunction associated with critical illness. *The Journal of surgical research*. 2004;121(2):178-86.
148. Jung WJ, Park BH, Chung KS, Kim SY, Kim EY, Jung JY, et al. Glucagon levels, disease severity, and outcome in severe sepsis. *Shock*. 2015;43(6):563-8.
149. Shah SV, Wallin JD, Eilen SD. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1983;57(2):402-9.
150. Blumenthal MN, Brody TM. Studies on the mechanism of drug-induced bronchiolar relaxation in the guinea pig. *The Journal of allergy*. 1969;44(2):63-9.
151. Sherman MS, Lazar EJ, Eichacker P. A bronchodilator action of glucagon. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1988;81(5 Pt 1):908-11.
152. Melanson SW, Bonfante G, Heller MB. Nebulized glucagon in the treatment of bronchospasm in asthmatic patients. *The American journal of emergency medicine*. 1998;16(3):272-5.
153. Imbruce R, Goldfedder A, Maguire W, Briscoe W, Nair S. The effect of glucagon on airway resistance. *Journal of clinical pharmacology*. 1975;15(10):680-4.
154. Wilber ST, Wilson JE, Blanda M, Gerson LW, Meerbaum SO, Janas G. The bronchodilator effect of intravenous glucagon in asthma exacerbation: a randomized, controlled trial. *Annals of emergency medicine*. 2000;36(5):427-31.
155. Bhatena SJ, Gazdar AF, Schechter GP, Russell EK, Soehnlen FE, Gritsman A, et al. Expression of glucagon receptors on T- and B- lymphoblasts: comparison with insulin receptors. *Endocrinology*. 1982;111(2):684-92.
156. Koh WS, Lee M, Yang KH, Kaminski NE. Expression of functional glucagon receptors on lymphoid cells. *Life sciences*. 1996;58(9):741-51.
157. Garcia Leme J, Morato M, Souza MZ. Anti-inflammatory action of glucagon in rats. *British journal of pharmacology*. 1975;55(1):65-8.
158. Insuela DBR, Silva PMR, Martins MA, Carvalho VF. The Yin Yang of Hormones that Control Glucose Homeostasis in Asthma. *J Aller Ther*. 2013;S11:1-8.

159. Sirianni MC, Annibale B, Tagliaferri F, Fais S, De Luca S, Pallone F, et al. Modulation of human natural killer activity by vasoactive intestinal peptide (VIP) family. VIP, glucagon and GHRF specifically inhibit NK activity. *Regulatory peptides*. 1992;38(1):79-87.
160. Coelho LP, Serra MF, Pires AL, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, dos Santos MH, et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;327(1):206-14.
161. Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K, et al. Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle. *European journal of pharmacology*. 2006;552(1-3):135-42.
162. Schlemper V, Medeiros R, Ferreira J, Campos MM, Calixto JB. Mechanisms underlying the relaxation response induced by bradykinin in the epithelium-intact guinea-pig trachea in vitro. *British journal of pharmacology*. 2005;145(6):740-50.
163. Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, et al. Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology*. 2012;117(3):580-91.
164. Insuela DB, Daleprane JB, Coelho LP, Silva AR, e Silva PM, Martins MA, et al. Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E(2). *The Journal of endocrinology*. 2015;225(3):205-17.
165. Steiner AA, Li S, Llanos QJ, Blatteis CM. Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous- and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9(5):263-75.
166. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
167. Frevert CW, Wong VA, Goodman RB, Goodwin R, Martin TR. Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. *Journal of immunological methods*. 1998;213(1):41-52.
168. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1998;46(8):895-900.
169. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*: Wiley; 2000.
170. Olsen PC, Ferreira TP, Serra MF, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, et al. Lidocaine-derivative JMF2-1 prevents ovalbumin-induced airway inflammation by regulating the function and survival of T cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2011;41(2):250-9.
171. Das AM, Williams TJ, Lobb R, Nourshargh S. Lung eosinophilia is dependent on IL-5 and the adhesion molecules CD18 and VLA-4, in a guinea-pig model. *Immunology*. 1995;84(1):41-6.
172. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of immunological methods*. 1985;83(2):209-15.
173. Humbles AA, Conroy DM, Marleau S, Rankin SM, Palframan RT, Proudfoot AE, et al. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: analysis in a guinea pig model in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(4):601-12.

174. Rosenberry TL, Sonoda LK, Dekat SE, Cusack B, Johnson JL. Monitoring the reaction of carbachol with acetylcholinesterase by thioflavin T fluorescence and acetylthiocholine hydrolysis. *Chemico-biological interactions*. 2008;175(1-3):235-41.
175. Wu D, Lee D, Sung YK. Prospect of vasoactive intestinal peptide therapy for COPD/PAH and asthma: a review. *Respiratory research*. 2011;12:45.
176. Tlili M, Rouatbi S, Sriha B, Ben Rhouma K, Sakly M, Vaudry D, et al. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Reverses Ammonium Metavanadate-Induced Airway Hyperresponsiveness in Rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:787561.
177. Cho YM, Merchant CE, Kieffer TJ. Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2012;135(3):247-78.
178. Perret J, Van Craenenbroeck M, Langer I, Vertongen P, Gregoire F, Robberecht P, et al. Mutational analysis of the glucagon receptor: similarities with the vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)/secretin receptors for recognition of the ligand's third residue. *The Biochemical journal*. 2002;362(Pt 2):389-94.
179. Folkerts G, Nijkamp FP. Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends in pharmacological sciences*. 1998;19(8):334-41.
180. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nature medicine*. 2012;18(5):684-92.
181. Hoymann HG. Lung function measurements in rodents in safety pharmacology studies. *Frontiers in pharmacology*. 2012;3:156.
182. Borges Mde C, Ferraz E, Vianna EO. Bronchial provocation tests in clinical practice. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2011;129(4):243-9.
183. Pelaia G, Renda T, Gallelli L, Vatrella A, Busceti MT, Agati S, et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: implications for asthma. *Respiratory medicine*. 2008;102(8):1173-81.
184. Hartney JM, Coggins KG, Tilley SL, Jania LA, Lovgren AK, Audoly LP, et al. Prostaglandin E2 protects lower airways against bronchoconstriction. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(1):L105-13.
185. Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(3):141-51.
186. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998;12(10):773-90.
187. Molloy ES, Morgan MP, Doherty GA, McDonnell B, Hilliard M, O'Byrne J, et al. Mechanism of basic calcium phosphate crystal-stimulated cyclo-oxygenase-1 up-regulation in osteoarthritic synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(7):965-71.
188. Zhang XP, Hintze TH. cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(6):H2376-84.
189. Han EH, Kim HG, Hwang YP, Choi JH, Im JH, Park B, et al. The role of cyclooxygenase-2-dependent signaling via cyclic AMP response element activation on aromatase up-regulation by o,p'-DDT in human breast cancer cells. *Toxicology letters*. 2010;198(3):331-41.
190. Madsen L, Pedersen LM, Liaset B, Ma T, Petersen RK, van den Berg S, et al. cAMP-dependent signaling regulates the adipogenic effect of n-6 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(11):7196-205.
191. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, et al. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *J Immunol*. 2008;180(11):7664-72.

192. Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;288(2):L333-41.
193. Spond J, Billah MM, Chapman RW, Egan RW, Hey JA, House A, et al. The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2004;17(3):133-40.
194. Hsia BJ, Pastva AM, Giamberardino CD, Potts-Kant EN, Foster WM, Que LG, et al. Increased Nitric Oxide Production Prevents Airway Hyperresponsiveness in Caveolin-1 Deficient Mice Following Endotoxin Exposure. *Journal of allergy & therapy*. 2012;Suppl 1(4).
195. Moore G, Knight G, Blann A. *Haematology*: OUP Oxford; 2010.
196. Meidan R. *The Life Cycle of the Corpus Luteum*: Springer International Publishing; 2016.
197. Al-essa L, Niwa M, Kobayashi M, Nozaki M, Tsurumi K. Glucagon modulates superoxide generation in human polymorphonuclear leucocytes. *Life sciences*. 1993;53(18):1439-45.
198. Ariga M, Neitzert B, Nakae S, Mottin G, Bertrand C, Pruniaux MP, et al. Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation. *J Immunol*. 2004;173(12):7531-8.
199. Cedervall P, Aulabaugh A, Geoghegan KF, McLellan TJ, Pandit J. Engineered stabilization and structural analysis of the autoinhibited conformation of PDE4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(12):E1414-22.
200. Wang M, Gao P, Wu X, Chen Y, Feng Y, Yang Q, et al. Impaired anti-inflammatory action of glucocorticoid in neutrophil from patients with steroid-resistant asthma. *Respiratory research*. 2016;17(1):153.
201. Sousa LP, Lopes F, Silva DM, Tavares LP, Vieira AT, Rezende BM, et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):895-904.
202. Totani L, Piccoli A, Dell'Elba G, Concetta A, Di Santo A, Martelli N, et al. Phosphodiesterase type 4 blockade prevents platelet-mediated neutrophil recruitment at the site of vascular injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34(8):1689-96.
203. Konya V, Maric J, Jandl K, Luschnig P, Aringer I, Lanz I, et al. Activation of EP4 receptors prevents endotoxin-induced neutrophil infiltration into the airways and enhances microvascular barrier function. *British journal of pharmacology*. 2015.
204. Cook S, Vollenweider P, Menard B, Egli M, Nicod P, Scherrer U. Increased eNO and pulmonary iNOS expression in eNOS null mice. *The European respiratory journal*. 2003;21(5):770-3.
205. Thomassen MJ, Buhrow LT, Connors MJ, Kaneko FT, Erzurum SC, Kavuru MS. Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1997;17(3):279-83.
206. Ten Broeke R, De Crom R, Van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, Van Ark I, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. *Respiratory research*. 2006;7:58.
207. Lee WJ, Tateya S, Cheng AM, Rizzo-DeLeon N, Wang NF, Handa P, et al. M2 Macrophage Polarization Mediates Anti-inflammatory Effects of Endothelial Nitric Oxide Signaling. *Diabetes*. 2015;64(8):2836-46.

208. Gropper MA, Wiener-Kronish J. The epithelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Current opinion in critical care*. 2008;14(1):11-5.
209. Manicone AM. Role of the pulmonary epithelium and inflammatory signals in acute lung injury. *Expert review of clinical immunology*. 2009;5(1):63-75.
210. Cormet-Boyaka E, Jolivette K, Bonnegarde-Bernard A, Rennolds J, Hassan F, Mehta P, et al. An NF-kappaB-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2012;125(2):418-29.
211. Allen TC, Kurdowska A. Interleukin 8 and acute lung injury. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2014;138(2):266-9.
212. Wang J, Wang C, Li X, Kong L, Gao K, Liu RY. The effects of anti-asthma drugs on the phagocytic clearance of apoptotic eosinophils by A549 cells. *Respiratory medicine*. 2009;103(11):1693-9.
213. Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(8):959-67.
214. Keane-Myers A, Wysocka M, Trinchieri G, Wills-Karp M. Resistance to antigen-induced airway hyperresponsiveness requires endogenous production of IL-12. *J Immunol*. 1998;161(2):919-26.
215. van Wetering S, Zuyderduyn S, Ninaber DK, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Hiemstra PS. Epithelial differentiation is a determinant in the production of eotaxin-2 and -3 by bronchial epithelial cells in response to IL-4 and IL-13. *Molecular immunology*. 2007;44(5):803-11.
216. Abonyo BO, Alexander MS, Heiman AS. Autoregulation of CCL26 synthesis and secretion in A549 cells: a possible mechanism by which alveolar epithelial cells modulate airway inflammation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;289(3):L478-88.
217. Matsukura S, Stellato C, Georas SN, Casolaro V, Plitt JR, Miura K, et al. Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;24(6):755-61.
218. Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(7):1767-73.
219. Nakamura H, Luster AD, Tateno H, Jedrzkiewicz S, Tamura G, Haley KJ, et al. IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281(5):L1288-302.
220. Brooks EG, Balk SP, Aupeix K, Colonna M, Strominger JL, Groh-Spies V. Human T-cell receptor (TCR) alpha/beta + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V beta-gene families, and phenotypically resemble memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(24):11787-91.
221. Ortolani C. *Flow Cytometry of Hematological Malignancies*: Wiley; 2011.
222. Mostafa G, Lamont C, Greene FL. *Review of Surgery: Basic Science and Clinical Topics for ABSITE*: Springer New York; 2006.
223. Maslanka T, Otrocka-Domagala I, Zuska-Prot M, Mikiewicz M, Przybysz J, Jasiocka A, et al. IkappaB kinase beta inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4(+) effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes. *European journal of pharmacology*. 2016;775:78-85.
224. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:925135.

225. Koretzky GA. Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *J Immunol.* 2010;185(5):2643-4.
226. Porrett PM, Lee MKt, Lian MM, Wang J, Caton AJ, Deng S, et al. A direct comparison of rejection by CD8 and CD4 T cells in a transgenic model of allotransplantation. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis.* 2008;56(3):193-200.
227. Riffo-Vasquez Y, Spina D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. *Pharmacology & therapeutics.* 2002;94(3):185-211.
228. Gerlo S, Verdood P, Kooijman R. Modulation of cytokine production by cyclic adenosine monophosphate analogs in human leukocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 2010;30(12):883-91.
229. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine.* 2012;18(5):673-83.
230. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews Immunology.* 2010;10(12):838-48.
231. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118(11):3546-56.
232. Park CS, Lee SM, Chung SW, Uh S, Kim HT, Kim YH. Interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma. *Chest.* 1994;106(2):400-6.
233. Leung DY, Martin RJ, Szeffler SJ, Sher ER, Ying S, Kay AB, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *The Journal of experimental medicine.* 1995;181(1):33-40.
234. Loppow D, Huland E, Heinzer H, Gronke L, Magnussen H, Holz O, et al. Interleukin-2 inhalation therapy temporarily induces asthma-like airway inflammation. *Eur J Med Res.* 2007;12(11):556-62.
235. Liang Q, Guo L, Gogate S, Karim Z, Hanifi A, Leung DY, et al. IL-2 and IL-4 stimulate MEK1 expression and contribute to T cell resistance against suppression by TGF-beta and IL-10 in asthma. *J Immunol.* 2010;185(10):5704-13.
236. Kumar RK, Webb DC, Herbert C, Foster PS. Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006;5(4):253-6.
237. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol.* 2010;184(4):1663-74.
238. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1281-90.
239. Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nature reviews Drug discovery.* 2004;3(10):831-44.
240. Huang SK, Scruggs AM, Donaghy J, McEachin RC, Fisher AS, Richardson BC, et al. Prostaglandin E(2) increases fibroblast gene-specific and global DNA methylation via increased DNA methyltransferase expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2012;26(9):3703-14.

8. Anexos

8.1. Artigos publicados durante o doutorado

- ✓ **Insuela, DBR.**; Daleprane, JB; Cpelho, LP; Silva, AR; Silva, PMR; Martins, MA; Carvalho, VF. Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E2. *Journal of Endocrinology*. 2015; 225:205-17.
- ✓ Vieira, AB; Coelho, LP; **Insuela, DBR.**; Carvalho, VF; Dos Santos, MH; Silva, PMR; Martins, MA. Mangiferin Prevents Guinea Pig Tracheal Contraction via Activation of the Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway. *PlosOne*. 2013; 8: 1-11.

8.2. Artigo submetido durante o doutorado

- ✓ **Insuela, DBR.**; Carvalho, VF. Glucagon and glucagon-like peptide-1 as a novel anti-inflammatory and immunomodulatory compounds. *European Journal of Pharmacology*. 2017.

Glucagon induces airway smooth muscle relaxation by nitric oxide and prostaglandin E₂

Daniella B R Insuela, Julio B Daleprane¹, Luciana P Coelho, Adriana R Silva², Patrícia M R e Silva, Marco A Martins and Vinicius F Carvalho

Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, n° 4365, Manguinhos, CEP 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

¹Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Francisco Xavier, n° 524, CEP 20559-900 Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, n° 4365, Manguinhos, CEP 21040-360 Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence should be addressed to V F Carvalho

Email
vfrias@ioc.fiocruz.br

Abstract

Glucagon is a hyperglycemic pancreatic hormone that has been shown to provide a beneficial effect against asthmatic bronchospasm. We investigated the role of this hormone on airway smooth muscle contraction and lung inflammation using both *in vitro* and *in vivo* approaches. The action of glucagon on mouse cholinergic tracheal contraction was studied in a conventional organ bath system, and its effect on airway obstruction was also investigated using the whole-body pletysmographic technique in mice. We also tested the effect of glucagon on lipopolysaccharide (LPS)-induced airway hyperreactivity (AHR) and inflammation. The expression of glucagon receptor (GcgR), CREB, phospho-CREB, nitric oxide synthase (NOS)-3, pNOS-3 and cyclooxygenase (COX)-1 was evaluated by western blot, while prostaglandin E₂ (PGE₂) and tumour necrosis factor- α were quantified by enzyme-linked immunoassay and ELISA respectively. Glucagon partially inhibited carbachol-induced tracheal contraction in a mechanism clearly sensitive to des-His1-[Glu9]-glucagon amide, a GcgR antagonist. Remarkably, GcgR was more expressed in the lung and trachea with intact epithelium than in the epithelium-denuded trachea. In addition, the glucagon-mediated impairment of carbachol-induced contraction was prevented by either removing epithelial cells or blocking NOS (L-NAME), COX (indomethacin) or COX-1 (SC-560). In contrast, inhibitors of either heme oxygenase or COX-2 were inactive. Intranasal instillation of glucagon inhibited methacholine-induced airway obstruction by a mechanism sensitive to pretreatment with L-NAME, indomethacin and SC-560. Glucagon induced CREB and NOS-3 phosphorylation and increased PGE₂ levels in the lung tissue without altering COX-1 expression. Glucagon also inhibited LPS-induced AHR and bronchoalveolar inflammation. These findings suggest that glucagon possesses airway-relaxing properties that are mediated by epithelium-NOS-3-NO- and COX-1-PGE₂-dependent mechanisms.

Key Words

- ▶ glucagon
- ▶ nitric oxide
- ▶ prostaglandins
- ▶ lung
- ▶ muscle

Journal of Endocrinology
(2015) 225, 205–217

Introduction

Glucagon is a 29-amino-acid peptide hormone secreted during fasting periods by the pancreatic islet α -cells into hepatic portal venous circulation in response to falling glucose levels (Conarello *et al.* 2007, Cryer 2012). Glucagon acts as a counter-regulatory hormone to insulin and the combined action of both hormones maintains glucose homeostasis. While insulin acts primarily in response to low blood glucose levels by stimulating tissue and cellular uptake of glucose and hepatic glycogen synthesis, glucagon increases hepatic glucose production and its release into the bloodstream by stimulating glycogenolysis and gluconeogenesis (Quesada *et al.* 2008, Cryer 2012).

Moreover, glucagon has several effects in extra-hepatic tissues, including positive inotropic effects in the heart, lipolysis in adipose tissue, inducing satiety signals in the CNS and regulatory effects on the glomerular filtration rate in the kidneys. The action of glucagon is correlated with the tissue distribution of its specific receptor, which is highly expressed in the liver and kidney and expressed to a lesser extent in the heart, adipose tissue and cerebral cortex (Authier & Desbuquois 2008, Jones *et al.* 2012). Glucagon receptor (GcgR) is a member of the seven-transmembrane receptors coupled to the G stimulatory (Gs) protein. When glucagon binds to its receptor, the α -subunit of Gs leads to the activation of adenylyl cyclase, with a subsequent increase in the intracellular levels of cAMP (Qureshi *et al.* 2004, Authier & Desbuquois 2008, Altarejos & Montminy 2011).

cAMP regulates several airway smooth muscle (ASM) cell functions, including proliferation, migration, secretion of inflammatory mediators, and production of extracellular matrix components. In the lungs, cAMP has a major effect on ASM contraction (Billington *et al.* 2013). Elevation of intracellular cAMP induces relaxation of ASM through several mechanisms, including reduction in the intracellular Ca^{2+} concentration, decreased Ca^{2+} sensitivity, activation of Ca^{2+} -dependent K^{+} channels, and inhibition of inositol phospholipid hydrolysis, as well as an impaired ability to promote myosin light chain phosphorylation (Oguma *et al.* 2006, Roscioni *et al.* 2011, Olsen *et al.* 2012, Billington *et al.* 2013). β -adrenergic agonists are the drugs of choice for treatment of acute bronchospasm in asthmatic subjects, which remarkably induce airway relaxation by elevating cAMP levels in ASM (Horvat *et al.* 2012). Currently, the literature described that several hormones responsible for regulation of metabolism are able to modulate the contractile response of ASM through induction of contraction, including insulin, or relaxation,

like epinephrine, estrogen and progesterone (Bosse 2014). Since the effect of glucagon on ASM contraction is poorly understood and mouse lungs express GcgR and its activation leads to an increase in the intracellular cAMP (Authier & Desbuquois 2008), we undertook this study to evaluate the putative mechanism underlying the antispasmodic effect of glucagon on ASM.

Materials and methods

Animals

Male A/J mice (18–20 g) were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation breeding colony and used in accordance with the guidelines of the Committee on Use of Laboratory Animals of the Oswaldo Cruz Foundation (CEUA-FIOCRUZ, license LW 23/11). Mice were housed in groups of five in a temperature-, humidity- and light-controlled (12 h light:12 h darkness cycle) colony room. Mice were given *ad libitum* access to food and water.

Tracheal smooth muscle contraction *in vitro*

Mice were euthanized in a CO_2 chamber before the tracheas were dissected free of adhering fat and connective tissue. Tracheas were then mounted in isolated organ baths filled with 10 ml of aerated (95% O_2 and 5% CO_2) Krebs' buffer (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 24 mM NaHCO_3 and 11 mM glucose) and kept at 37 °C. An initial tension of 1 g was applied to the tracheas for 60 min to obtain a constant resting tension. Then, the response to carbachol (2.5 μM) was recorded to confirm the viability of the preparation. After washout of carbachol and re-establishment of the baseline resting tension, concentration curves were constructed with the cumulative addition of carbachol (10^{-8} – 10^{-4} M) in the presence of glucagon (0.1 and 1 μM) or 0.9% NaCl sterile solution. The treatment with glucagon was carried out 30 min before tissues were re-exposed to carbachol. All responses were expressed as percentages of the response to 2.5 μM carbachol.

In some experiments, epithelial cells were removed mechanically, as described previously (Coelho *et al.* 2008). The contractile response to the cumulative addition of carbachol was measured in intact or denuded epithelium tracheas in the presence or absence of glucagon. To investigate glucagon's antispasmodic mechanisms of action, tracheas were pretreated with a GcgR antagonist (des-his1-[Glu9]-glucagon amide – 1 μM)

(Leibiger *et al.* 2012) and with inhibitors of adenylyl cyclase (SQ 22 536 – 5 μ M), nitric oxide synthase (NOS) (L-NAME – 100 μ M) (Coelho *et al.* 2008), heme oxygenase (HO) (ZnPP IX – 10 μ M) (Undem *et al.* 1996), cyclooxygenase (COX) (indomethacin – 10 μ M) (Coelho *et al.* 2008), COX-1 (SC-560 – 1 μ M) (Ito *et al.* 2006) and COX-2 (NS-398 – 0.03 μ M) (Schlemper *et al.* 2005). Stimulation-induced isometric contractile responses were measured with a force-displacement transducer (Ugo Basile, Comerio, Italy) and the readout used to assess contractility was obtained by isolated organ data acquisition software (Proto 5; Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain). Contractile responses were expressed as a percentage of the maximal contraction induced by 2.5 μ M carbachol.

Non-invasive *in vivo* assessment of airway obstruction

Using barometric whole-body plethysmography (Buxco Research System, Wilmington, NC, USA) as described (Hamelmann *et al.* 1997), we measured the enhanced pause (Penh) responses in conscious, spontaneously breathing mice following appropriate provocations. Aerosolized PBS and increasing methacholine concentrations (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/ml) were nebulized through an inlet of the individual chambers for 2.5 min, and Penh readings were recorded for 5 min following each nebulization. Penh averages were obtained at 1, 3 and 6 h after intranasal treatment with glucagon (1 μ g/kg) or 0.9% NaCl sterile solution.

LPS-induced lung inflammation

Male A/J mice were anesthetized with aerosolized isoflurane for stimulation by nasal instillation with LPS (25 μ g/25 μ l) or 0.9% NaCl sterile solution. Treatment with glucagon was intranasally given 1 h before LPS provocation. Untreated mice received intranasal administration of 0.9% NaCl sterile solution.

Measurement of pulmonary inflammation by bronchoalveolar lavage fluid

Eighteen hours after the LPS provocation, mice were euthanized by anesthetic overdose (sodium thiopental, 500 mg/kg, i.p.). Cells were recovered from the airway lumen through bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Airways were flushed twice with 0.75 ml PBS containing 10 mM EDTA via a tracheal cannula. BALF was centrifuged (400 g, 10 min, 4 °C) and cell pellets were resuspended in 250 μ l PBS plus EDTA for further enumeration of leukocytes in a Neubauer chamber, by means of a light

microscope (BX40; Olympus), after dilution in Türk solution (2% acetic acid). Differential cell counts were carried out on May–Grunwald–Giemsa-stained cytospin preparations under oil immersion objective to determine the percentage of mononuclear cells and neutrophils.

Invasive assessment of respiratory mechanics

Mice were anesthetized (nembutal 60 mg/kg, i.p.) and subjected to both endotracheal and esophageal intubations for pulmonary function and airway hyperreactivity (AHR) assessment in a FinePointe Buxco Platform (Buxco Electronics, Sharon, CT, USA), as previously described (Serra *et al.* 2012). This assessment was carried out in mechanically ventilated mice under neuromuscular blockade induced by pancuronium bromide (1 mg/kg, i.p.).

Lung resistance (RL) (cm H₂O/ml per s) and dynamic lung compliance (C_{dyn}) (ml/cm H₂O) in each breath cycle were calculated based on airflow and pressure signals. The former was measured using the differential pressure changes in the whole-body plethysmograph as the animal breathed in and out, whereas the latter was measured at the mouth (airway pressure). Airway pressure at the mouth and the esophageal pressure were taken into consideration in order to obtain RL values not masked by the resistance component that comes from the chest wall. Analog signals were digitized using a Buxco Analog/Digital Converter (Buxco Electronics). Mice were allowed to stabilize for 5 min and were stimulated by the inhalation of increasing concentrations of aerosolized methacholine (3, 9 and 27 mg/ml) for 5 min each. Baseline measurements of pulmonary parameters were obtained by exposure to the vehicle (PBS) (Ferreira *et al.* 2013). In all experiments, the animals received glucagon (0.1, 1 or 10 μ g/kg, i.n.) or NaCl sterile solution (0.9%, i.n.) 3 h before the inhalation of aerosolized methacholine. In some experiments, the animals were pretreated intraperitoneally with L-NAME (20 mg/kg) (Coelho *et al.* 2008), indomethacin (10 mg/kg) (Steiner *et al.* 2001) or SC-560 (5 mg/kg) (Steiner *et al.* 2001) 30 min before glucagon administration. The control animals received the same amount of vehicle i.p. (0.9% NaCl or DMSO 0.3 and 1.6% for indomethacin and SC-560 respectively). In another set of experiments, we analyzed the AHR to increasing concentrations of aerosolized methacholine (3, 9 and 27 mg/ml) 18 h after the LPS provocation (25 μ g/25 μ l, i.n.).

Western blot

Lung tissue as well as intact and denuded epithelium tracheas was obtained to evaluate the GcGR expression.

To analyze the time-dependent stimulation or expression of CREB, NOS-3 and COX-1 induced by glucagon, lungs were recovered after instillation with glucagon (1 µg/kg) at several time intervals (5, 10, 15, 30, 60, 120 and 180 min). All tissues were homogenized in cold lysis buffer containing the protease inhibitor cocktail Complete (F. Hoffmann-La Roche Ltd) and 0.1% Triton X-100 in PBS. The lysate was centrifuged at 13 000 *g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was recovered and protein quantification was performed using the BCA assay (Sigma–Aldrich Corp.). Equal amounts of sample protein (50 µg/lane for GcgR and 100 µg/lane for CREB, phospho-CREB (pCREB), NOS-3, phospho-NOS-3 (pNOS-3) and COX-1 were loaded and separated on a 10% SDS–PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). After blocking in 5% (w/v) skimmed milk powder in TBS-T for 1 h, membranes were exposed overnight at 4 °C to either GcgR-, CREB-, pCREB-, NOS-3-, pNOS-3- (1:500; Santa Cruz Biotechnology), COX-1- (1:100; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) specific rabbit or mouse polyclonal antibodies or a β-actin-specific mouse monoclonal antibody (MAB) (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) followed by three washes and incubation with a HRP-conjugated secondary antibody (1:10 000; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and IRDye goat anti-rabbit secondary antibody or IRDye goat anti-mouse secondary antibody (both at 1:10 000; LI-COR Corporate, Lincoln, NE, USA) for 1 h at room temperature. The membranes were washed in TBS-T, and protein expression was detected using ECL (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) or fluorescence using the Odyssey Image System (LI-COR Corporate). The band intensity was quantified by densitometry using the software Image-Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MA, USA).

Prostaglandin E₂ measurement

Prostaglandin E₂ (PGE₂) levels were measured in lung tissue obtained at 15, 30, 60, 120 and 180 min after glucagon instillation (1 µg/kg) into mice. PGE₂ was assayed in the homogenized tissue using an enzyme-linked immunoassay (EIA) according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical).

TNF-α quantification

Eighteen hours after intranasal LPS provocation (25 µg/25 µl), the BALF recovered from the airway lumen was centrifuged (400 *g*, 10 min, 4 °C) and the supernatant immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –

80 °C. Tumour necrosis factor-α (TNF-α) was assayed in the BALF using a commercial ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

Drugs

Carbachol, methacholine, L-NAME, indomethacin, SC-560, NS-398, SQ 22 536, glucagon, des-his1-[Glu9]-glucagon amide, LPS and nebutal were purchased from Sigma Chemical Co. Pancuronium bromide, isoflurane and sodium thiopental were purchased from Cristália (São Paulo, Brazil), and ZnPP IX was purchased from Frontier Scientific (Logan, UT, USA). Glucagon, des-his1-[Glu9]-glucagon amide, carbachol, SQ 22 536, L-NAME, LPS, pancuronium bromide, nebutal and sodium thiopental were diluted in 0.9% NaCl sterile solution. Methacholine was diluted in PBS. Indomethacin, ZnPP IX, SC-560 and NS-398 were prepared in DMSO 0.1% for *in vitro* assays. Indomethacin and SC-560 were dissolved in DMSO 0.3 and 1.6% respectively, for *in vivo* experiments. All of the solutions were freshly prepared immediately before use.

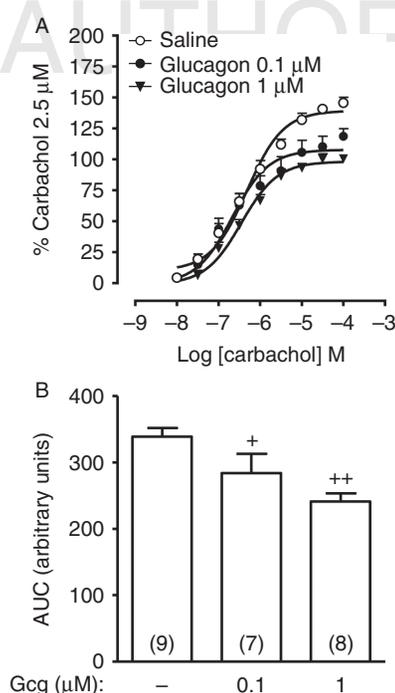
Statistical analysis

The data were reported as the mean ± s.e.m. and statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Newman–Keuls–Student's *t*-test. Probability values (*P*) of 0.05 or less were considered significant.

Results

Glucagon inhibits ASM contraction induced by carbachol *in vitro* by activating its receptor (GcgR) in the airway epithelium

Administration of increasing concentrations of carbachol (10⁻⁸–10⁻⁴ M) induced a smooth muscle contraction of tracheas obtained from A/J mice. Pretreatment with glucagon (0.1 and 1 µM) for 30 min before the addition of cumulative concentrations of carbachol inhibited tracheal contraction *in vitro* (Fig. 1). To evaluate the involvement of GcgR on the antispasmodic effect of glucagon *in vitro*, we pre-incubated the trachea preparations with an adenylyl cyclase inhibitor (SQ 22 536; 5 µM) or a GcgR antagonist (des-his1-[Glu9]-glucagon amide; 1 µM). Both SQ 22 536 and des-his1-[Glu9]-glucagon amide significantly inhibited the antispasmodic effect of glucagon on the carbachol-induced contractile trachea response (Fig. 2A and B respectively). Unexpectedly, the tracheas that only received SQ 22 536

**Figure 1**

Glucagon prevents the carbachol-stimulated contraction of mouse tracheas *in vitro*. (A) Effect of glucagon on tracheal contraction induced by carbachol (10^{-8} – 10^{-4} M). (B) The AUC was calculated from the concentration-response curves of contraction caused by carbachol. All of the results are expressed as the percentage of contractile responses induced by 2.5 μM carbachol. Each value represents the mean \pm S.E.M. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman–Keuls–Student's *t*-test. $^+P < 0.05$ compared to untreated group. $^{++}P < 0.01$ compared to untreated group. Gcg, glucagon.

showed an inhibition of smooth muscle contraction induced by carbachol *in vitro* (Fig. 2A).

Then, we assessed the putative role played by the epithelium in the glucagon relaxing effect. As shown in Fig. 2C, the mechanical removal of the epithelial cell layer clearly abrogated the protective effect of glucagon on carbachol-induced tracheal contraction. We further investigated the expression of GcgR in mice tracheas in the presence or absence of epithelium. As observed in Fig. 2D, the GcgR was significantly less expressed in epithelium-denuded tracheas than in tracheas with intact epithelium and the positive controls (lungs).

Inhibition of airway constriction by glucagon *in vitro* depends of nitric oxide and COX-1 products

To study which epithelium-derived factor could be involved in the antispasmodic effect of glucagon *in vitro*, we pre-incubated tracheas with NOS (L-NAME;

100 μM), HO (ZnPP IX; 10 μM) unselective COX (indomethacin; 10 μM), selective COX-1 (SC-560; 1 μM), or selective COX-2 (NS398; 0.03 μM) inhibitors 30 min before glucagon treatment. As illustrated in Fig. 3, co-incubation with L-NAME, indomethacin, or SC-560 clearly prevented the antispasmodic effect of glucagon in tracheas subjected to carbachol-induced contraction *in vitro*, whereas exposure to ZnPP IX or NS-398 was inactive.

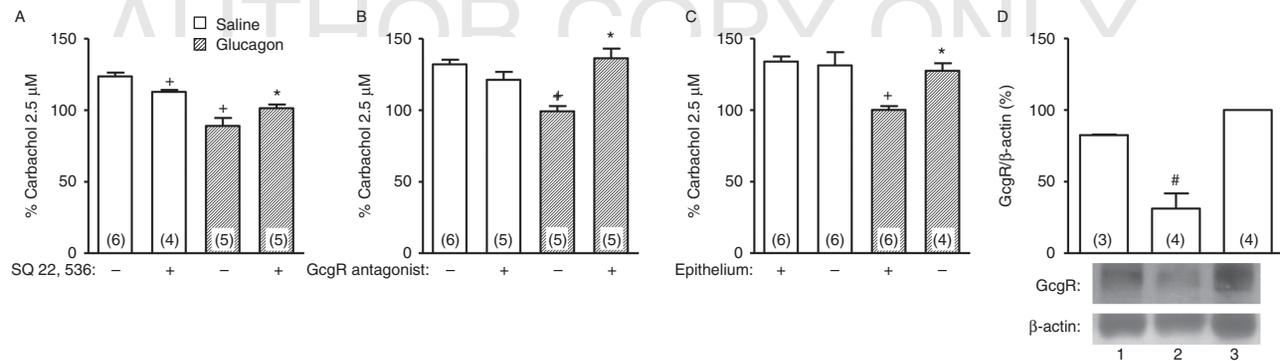
Glucagon prevents methacholine-induced ASM contraction *in vivo*

While using the non-invasive barometric plethysmography, we observed that glucagon (1 μg/kg, i.n.) significantly inhibited methacholine-induced bronchospasm in mice. The best blockade of the cholinergic bronchoconstrictive response was noted when the treatment was performed 3 h before methacholine. Specifically, for methacholine concentrations of 0, 6.25, 12.5, 25 and 50 mg/ml, the Penh values decreased from 0.58 ± 0.03 , 1.00 ± 0.11 , 1.93 ± 0.29 , 3.61 ± 0.84 and 5.25 ± 0.87 (mean \pm S.E.M., $n = 7$) respectively, to 0.52 ± 0.02 , 0.61 ± 0.016 , 0.74 ± 0.057 , 1.59 ± 0.20 and 3.41 ± 0.60 (mean \pm S.E.M., $n = 8$) respectively. The values for the area under the curve (AUC) were analyzed by a range of concentrations between 0 and 50 mg/ml. The AUC values of animals treated with glucagon decreased from 159.7 ± 28.3 (mean \pm S.E.M., $n = 7$) to 85.1 ± 8.7 (mean \pm S.E.M., $n = 8$), which correspond to a blockade of $46.7 \pm 5.4\%$ (mean \pm S.E.M., $n = 8$) as compared to the vehicle-treated animals. For treatments occurring at 1 h or 6 h before, the inhibition levels were of 32.8 ± 4.9 and $20.8 \pm 8.7\%$ (mean \pm S.E.M., $n = 8$) respectively.

In another setting of experiments, we evaluated the effect of intranasal glucagon upon methacholine-induced changes in increased RL (Fig. 4A and B) and decreased Cdyn in A/J mice (Fig. 4C and D). Treatment with glucagon (0.1, 1 and 10 μg/kg, i.n.) 3 h before provocation inhibited the methacholine-induced increase in RL (Fig. 4A and B) and reduction in Cdyn (Fig. 4C and D). In both lung function parameters, the dose of 1 μg/kg glucagon was more effective, and significantly increased the baseline values of Cdyn.

NO and COX-1 products are key factors in the antispasmodic effect of glucagon on methacholine-evoked airways spasm *in vivo*

To investigate the possible mechanism involved in the antispasmodic action of glucagon *in vivo*, L-NAME (20 mg/kg), indomethacin (10 mg/kg) or SC-560 (5 mg/kg) were administered intraperitoneally 30 min before glucagon

**Figure 2**

The antispasmodic effect of glucagon on tracheal contraction induced by carbachol *in vitro* is mediated by the activation of the GcgR expressed in airway epithelium. Adenylyl cyclase inhibitor (SQ 22 536; 5 μ M) (A), GcgR antagonist (des-his1-[Glu9]-glucagon amide; 1 μ M) (B), and epithelium removal (C) blocked the antispasmodic effect of glucagon (1 μ M) on the tracheal contraction induced by carbachol (10^{-8} – 10^{-4} M) *in vitro*. (D) Expression of GcgR in tracheas from AJ mice was determined by western blot. Lanes 1, 2 and 3 are tracheas with intact epithelium, tracheas

with denuded epithelium and positive control (lung) respectively. The data were normalized to β -actin and represented as the ratio between the expressions of GcgR: β -actin relative to the control. Pooled samples of six animals were used in lanes 1 and 2. Each value represents the mean \pm s.e.m. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman–Keuls–Student's *t*-test. $^+P < 0.05$ compared to untreated group. $^*P < 0.05$ compared to glucagon-treated group. $^\#P < 0.05$ compared to intact epithelium trachea.

(1 μ g/kg, i.n.). All these treatments abrogated the glucagon protective effect concerning methacholine-induced changes in RL and Cdyn (Figs 5 and 6).

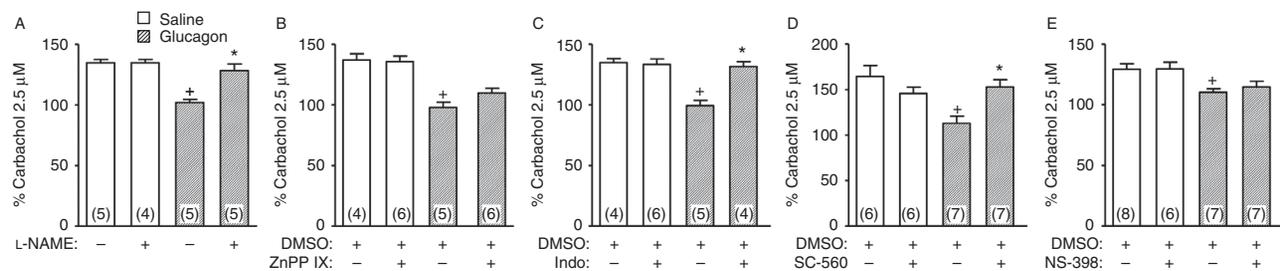
Glucagon administration induces CREB, NOS-3 and COX-1 activation in lungs of mice *in vivo*

To access the effect of glucagon on CREB, NOS-3 and COX-1 expression and activation, we performed a western blot and EIA analysis of lungs of mice instilled with glucagon (1 μ g/kg, i.n.) for different periods of time (5, 10, 15, 30, 60, 120 and 180 min). Glucagon phosphorylated CREB 15–30 min after its administration (Fig. 7A), while NOS-3 phosphorylation started at 30 min and remained detectable

for at least 180 min (Fig. 7B). Glucagon was followed by PGE₂ production from 30 to 180 min after instillation (Fig. 7D), without changes in COX-1 expression except a reduction noted at 180 min post-treatment (Fig. 7C).

Glucagon inhibits inflammation and AHR induced by LPS

Finally, we assessed whether the antispasmodic effect of glucagon might be kept in the context of inflammation. As compared with control mice challenged with saline, LPS intranasal provocation caused a significant increase in total leukocyte numbers detected in BALF, which was accounted for by elevations in the numbers of neutrophils and mononuclear cells (Fig. 8A) 18 h after provocation.

**Figure 3**

The antispasmodic effect of glucagon on the tracheal contraction induced by carbachol *in vitro* requires NOS and COX-1 metabolites, but not HO and COX-2 products. NOS (L-NAME; 100 μ M) (A), non-selective COX (indomethacin; 10 μ M) (C) or selective COX-1 (SC-560; 1 μ M) inhibitors (D) abolished the antispasmodic effect of glucagon (1 μ M) on tracheal contraction induced by carbachol (10^{-8} – 10^{-4} M) *in vitro*. HO (ZnPP IX; 10 μ M) (B) or selective COX-2 (NS-398; 0.03 μ M) inhibitors (E) had no effect

on the glucagon-mediated (1 μ M) inhibition of the tracheal contraction induced by carbachol (10^{-8} – 10^{-4} M) *in vitro*. Each value represents the mean \pm s.e.m. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman–Keuls–Student's *t*-test. $^+P < 0.05$ compared to untreated group. $^*P < 0.05$ compared to glucagon-treated group. Indo, indomethacin. DMSO (0.1%).

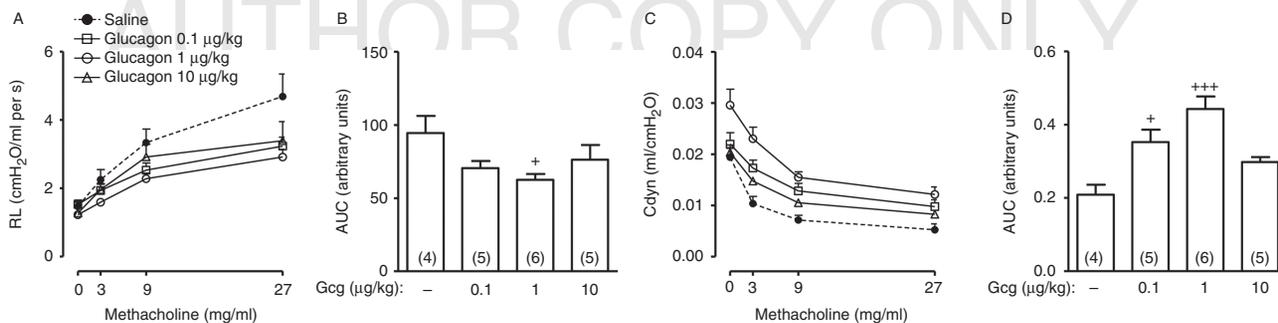


Figure 4 Glucagon administration inhibits the airway obstruction provoked by methacholine *in vivo*. The dose–response analysis of the antispasmodic effect of glucagon (0.1, 1 and 10 µg/kg, *i.n.*) on increased RL (A) and decreased Cdyn (C) induced by methacholine (0–27 mg/ml) *in vivo*. AUC was calculated from the concentration–response curves of RL (B) and Cdyn (D)

following exposure to methacholine (range: 0–27 mg/ml). Each value represents the mean ± s.e.m. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman–Keuls–Student’s *t*-test. ⁺*P* < 0.05 compared to untreated group. ⁺⁺⁺*P* < 0.001 compared to untreated group. Gcg, glucagon.

The LPS-induced leukocyte infiltrating response occurred in parallel with increased levels of TNF-α in lung tissue samples (Fig. 8B). All these inflammatory changes, except elevation in mononuclear cell counts, were clearly sensitive to glucagon (1 µg/kg, *i.n.*) given 1 h before LPS. Remarkably, the glucagon treatment clearly abrogated LPS-induced AHR regarding both RL changes (Fig. 8C and D) as well as Cdyn (Fig. 8E and F).

antispasmodic action of glucagon. The effect of glucagon on carbachol-induced trachea contraction was abrogated by removal of the epithelium and treatment with the NOS inhibitor, unselective COX inhibitor, or selective COX-1 inhibitor. Nasal instillation of glucagon induced CREB, NOS-3 and COX-1 activation in lung tissue. Furthermore, treatment with glucagon inhibited LPS-induced AHR and airway inflammation. Our findings indicate that glucagon prevents ASM contraction, acting through a synergic induction of NO and PGE₂ by airway epithelial cells.

Discussion and conclusion

In this study, we showed that glucagon prevents ASM contraction *in vitro* and *in vivo* induced by cholinergic agents in A/J mice. We showed that the activation of GcgR was essential in this effect, as both the adenylyl cyclase inhibitor and GcgR antagonist suppressed the

Several studies revealed a controversy surrounding the benefits of glucagon therapy in asthmatic patients. While some authors have shown an improvement in lung function after glucagon inhalation (Sherman *et al.* 1988, Melanson *et al.* 1998), others did not find any effect from

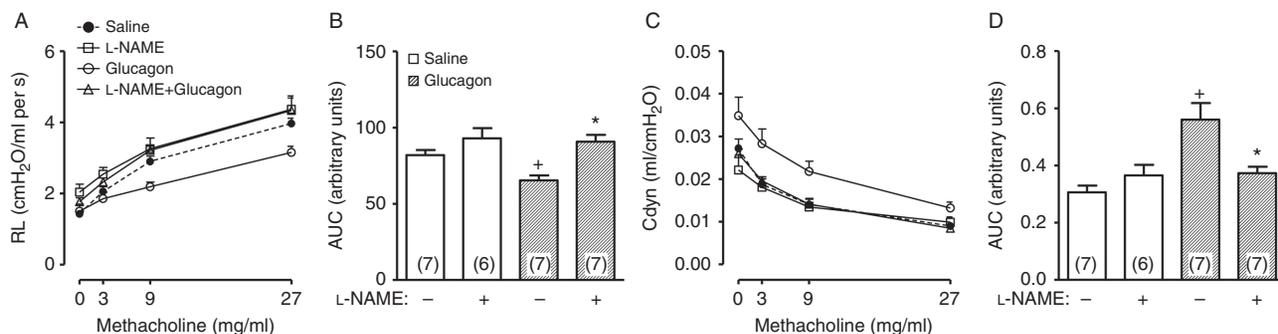
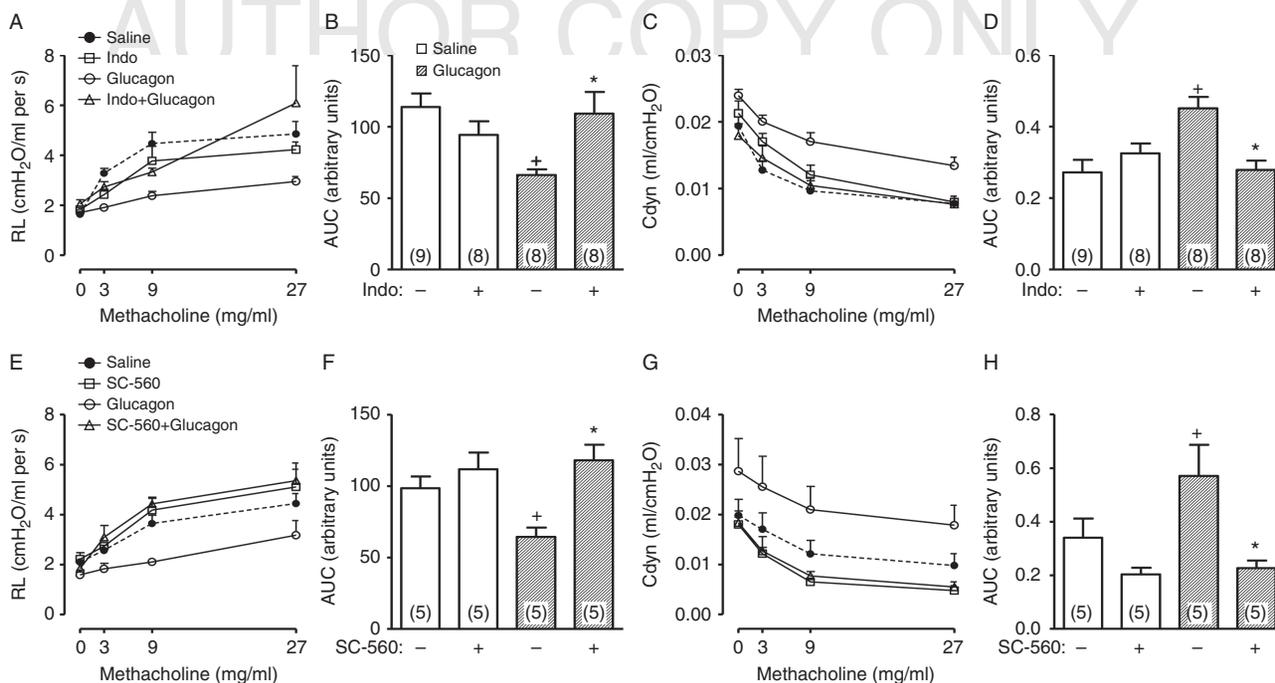


Figure 5 The antispasmodic effect of glucagon on methacholine-induced reduction in respiratory function *in vivo* depends on NO production. L-NAME (20 mg/kg, *i.p.*) reversed the antispasmodic effect of glucagon (1 µg/kg, *i.n.*) on increased RL (A) and decreased Cdyn (C) induced by methacholine (0–27 mg/ml) *in vivo*. AUC was calculated from the

concentration–response curves of RL (B) and Cdyn (D) following exposure to methacholine (range: 0–27 mg/ml). Each value represents the mean ± s.e.m. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman–Keuls–Student’s *t*-test. ⁺*P* < 0.05 compared to untreated group. ^{*}*P* < 0.05 compared to glucagon-treated group.

**Figure 6**

COX-1 derived products are involved in the antispasmodic effect of glucagon on methacholine-induced reduction in respiratory function *in vivo*. Indomethacin (10 mg/kg, i.p.) (A and C) and SC-560 (5 mg/kg, i.p.) (E and G) abolished the antispasmodic effect of glucagon (1 µg/kg, i.n.) on increased RL (A and E) and decreased Cdyn (C and G) induced by methacholine (0–27 mg/ml) *in vivo*. Following methacholine exposure (range: 0–27 mg/ml), the AUC was calculated from the concentration-

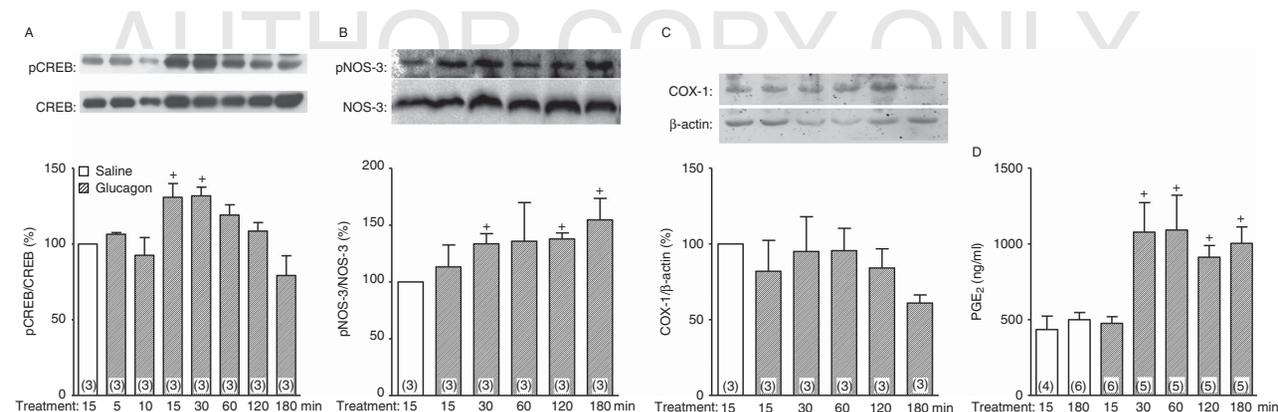
response curves of the RL (B and F) and Cdyn (D and H) of animals pre-treated with indomethacin (B and D) or SC-560 (F and H). Each value represents the mean ± S.E.M. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman-Keuls-Student's *t*-test. **P* < 0.05 compared to untreated group. +*P* < 0.05 compared to glucagon-treated group. Indo, indomethacin. DMSO (0.3 and 1.6% for indomethacin and SC-560 respectively).

the i.v. injection of this hormone (Imbruce *et al.* 1975, Wilber *et al.* 2000). Under our conditions, glucagon inhibited the carbachol-induced contractile response of tracheas in mice. These findings are in line with those of Blumenthal & Brody (1969), in which glucagon relaxed the bronchial smooth muscle in guinea pigs. In addition, vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide, which are peptides that have high homology with glucagon amino acid sequence (Mentlein 2009), also have the ability to relax ASMs *in vitro* (Sherman *et al.* 1988, Melanson *et al.* 1998).

In another set of experiments, we showed that the inhibition of adenylyl cyclase with SQ 22 536 reduced the antispasmodic activity of glucagon on carbachol-evoked contraction, indicating that this effect depends on the activation of adenylyl cyclase. Notably, GcgR is coupled to a Gs protein that activates adenylyl cyclase to produce cAMP (Habegger *et al.* 2010). We confirmed this hypothesis by showing that the GcgR antagonist des-his1-[Glu9]-glucagon amide abolished the effects of glucagon on tracheal smooth muscle contraction. Surprisingly, the antispasmodic

activity of glucagon on carbachol-evoked contraction was unapparent after removal of the tracheal epithelium, clearly showing the crucial role of epithelial cells in this protective effect. This result was unexpected, once the elevation of intracellular cAMP levels leads to a relaxation of ASM (Zieba *et al.* 2011, Billington *et al.* 2013). To better explain this finding, we evaluated the expression of GcgR on both tracheal and lung tissue in mice from the A/J strain. We noted that GcgR was much more expressed in tracheas with intact epithelium and lung tissues than in denuded tracheas. Despite the presence of GcgR in tracheas without epithelium, glucagon cannot exert its effect when the epithelium is removed. This happens perhaps because the amount of receptors in the trachea without epithelium is so small that it is not sufficient to induce a strong enough signal to relax tracheal smooth muscle. Thereby, these results show that the effect of glucagon occurs through its receptor activation in epithelial cells and not in smooth muscle cells directly.

The observation that the integrity of the airway epithelial layer is essential for the antispasmodic activity of glucagon *in vitro* shows that epithelial cells

**Figure 7**

Glucagon treatment increases CREB, NOS-3 and COX-1 activity in the lungs of *A/J* mice. Representative samples of pCREB (A), pNOS-3 (B) and COX-1 (C) expression in the lungs of glucagon-treated (1 μ g/kg, i.n.) animals. The expression of pCREB, pNOS-3 and COX-1 was determined by western blot. Data were normalized to CREB, NOS-3 and β -actin respectively.

(D) Quantification of PGE₂ levels in lungs from glucagon-treated animals was realized by EIA. Data are expressed as the mean \pm s.e.m. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman-Keuls-Student's *t*-test. ⁺*P* < 0.05 compared to untreated animals.

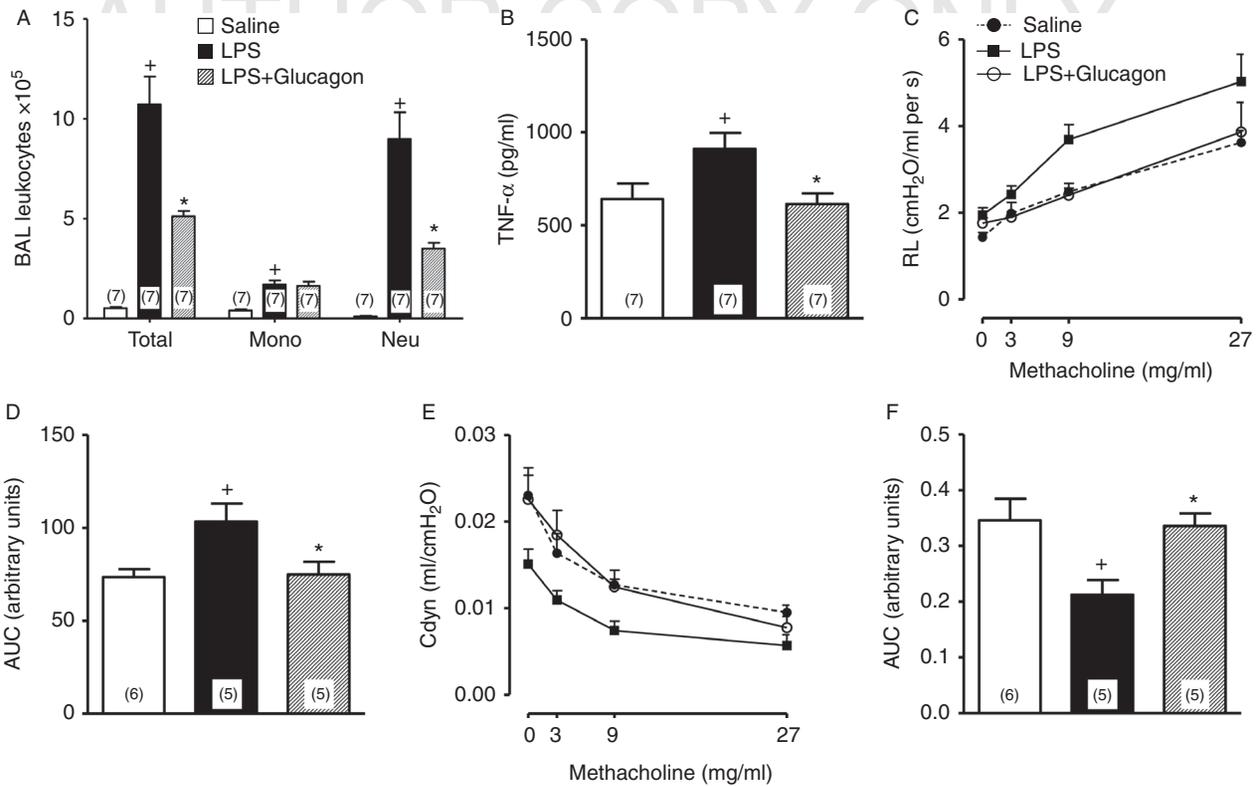
not only provide a crucial physical barrier that protects sensory nerves and smooth muscle cells from inhaled irritants (Folkerts & Nijkamp 1998, Schlemper *et al.* 2005) but also actively regulate the smooth muscle contractile machinery. In fact, the epithelium capacity to provide factors to relax the smooth muscle is firmly established. These factors include nitric oxide (NO), carbon monoxide, PGE₂ and prostacyclin, which protect the airway from excessive bronchoconstriction (Barnes 1998, de Sousa *et al.* 2010, Billington *et al.* 2013, Vieira *et al.* 2013). We tested several inhibitors to identify which factors produced by epithelial cells could be involved in the antispasmodic activity of glucagon *in vitro*. We observed that the protective effect of glucagon on the carbachol-induced contraction of mice tracheal was neither modified by HO inhibitor ZnPP IX nor by selective COX-2 inhibitor NS-398, precluding the involvement of carbon monoxide and COX-2 derived factors in this effect. Furthermore, we showed that the antispasmodic activity of glucagon upon carbachol-induced contraction was sensitive to pretreatment with the NOS inhibitor L-NAME, unselective COX inhibitor indomethacin and selective COX-1 inhibitor SC-560 *in vitro*. These results suggest that both NO and COX-1 metabolites are products derived from epithelial cells that are involved in the antispasmodic effect of glucagon *in vitro*.

To gain insight in the putative therapeutic application of the glucagon hormone, we used barometric plethysmography to assess the effectiveness of glucagon in airway contraction *in vivo*. We used two systems to measure methacholine-induced airway obstruction in mice

subjected to intranasal glucagon treatment. First, we used a non-invasive system and showed that glucagon significantly reduced methacholine-induced bronchoconstriction 3 h post-treatment. In agreement with this data, glucagon (1 μ g/kg, i.n.) yielded a significant blockade of RL as well as improved Cdyn as measured by an invasive assessment of lung function. One potential explanation for the lack of activity of 10 μ g/kg glucagon is the recognized ability of this hormone to cause GcGR desensitization (Krilov *et al.* 2011).

While trying to clarify whether the molecular mechanisms attributed to the glucagon effect *in vitro* are also relevant *in vivo*, we showed that L-NAME, indomethacin and SC-560 inhibited the protective effect of glucagon on the increase in RL and reduction of Cdyn caused by methacholine. These results confirmed the putative participation of NO and products of COX-1 in the antispasmodic effect of glucagon *in vivo*. Furthermore, we showed that glucagon promoted CREB phosphorylation in the lungs 15 and 30 min after its instillation. Once activation of GcGR increases intracellular levels of cAMP (Habegger *et al.* 2010) and CREB is phosphorylated in response to this second messenger (Altarejos & Montminy 2011), this results confirm *in vivo* our data obtained *in vitro* that showed that antispasmodic effect of glucagon depends on its receptor and adenylyl cyclase activation.

Because NOS-3 and COX-1 are constitutively expressed in respiratory epithelial cells (Maarsingh *et al.* 2005, Radi *et al.* 2010, Strapkova & Antosova 2011), and are also sensitive to expressional up-regulation (Forstermann *et al.* 1998, Molloy *et al.* 2008), we evaluated

**Figure 8**

LPS induced inflammation and AHR in the airways is sensitive to glucagon treatment. Glucagon inhibited leukocyte accumulation (total and differential cell counts) (A) and TNF- α levels (B) in BALF, 18 h after the provocation with LPS (25 μ g/25 μ l) or saline. Analysis of the antispasmodic effect of glucagon (1 μ g/kg, i.n.) on increased RL (C) and decreased Cdyn (E) induced by methacholine (0–27 mg/ml) in *A/J* mice provoked with

LPS (25 μ g/25 μ l) or saline. AUC was calculated from the concentration-response curves of RL (D) and Cdyn (F) following exposure to methacholine (range: 0–27 mg/ml). Each value represents the mean \pm s.e.m. The statistical analysis was performed by ANOVA followed by Newman–Keuls–Student's *t*-test. $^+P < 0.05$ compared to saline-provoked group. $^*P < 0.05$ compared to LPS-provoked group.

the activation and/or expression of NOS-3 and COX-1 after an intranasal glucagon treatment. We found that glucagon effectively increased the activation of NOS-3 and COX-1, evidenced by an increase of pNOS-3 and production of PGE₂ in the lung tissue from the time of 30 until 180 min after its administration, although glucagon did not enhance the COX-1 expression. These results showed that glucagon probably induces activation of NOS-3 and COX-1 through cAMP pathway, once CREB is phosphorylated before activation of both enzymes; likewise, cAMP can activate NOS and COX (Zhang & Hintze 2006, Han *et al.* 2010). In our study, both NOS-3 phosphorylation and PGE₂ production occurred from 30 to 180 min after glucagon treatment; thereby, we believed that NO and PGE₂ act synergistically. Furthermore, the presence of both pro-relaxation mediators all this time in the lungs explains why the antispasmodic effect of glucagon on methacholine-provoked airway obstruction is better 3 h post-instillation.

Finally, we investigated whether the glucagon effectiveness is maintained in the context of inflammation. Therefore, we assessed the impact of glucagon treatment on LPS-induced inflammatory response marked by activation of NOS-2 and production of high amounts of NO as previously reported (Hsia *et al.* 2012). Our results revealed that LPS provocation yielded a state of AHR, as determined by exacerbation on RL and Cdyn changes triggered by aerosolized methacholine. Moreover, we noted an intense leukocyte infiltration demonstrated by the accumulation of mononuclear cells and neutrophils in the BALF in association with increased levels of TNF- α . Remarkably, local glucagon treatment inhibited airway hyperreactivity, neutrophils accumulation and TNF- α production, supporting the interpretation that this hormone has also marked anti-inflammatory properties and can maintain its antispasmodic effect even in the presence of pro-inflammatory signals and overproduction of NO. It is likely that, as observed in the smooth muscle relaxing

effect, the anti-inflammatory effect of glucagon is also associated, in a causative manner, with NO and prostanoid generation. In fact, it is well established that PGE₂ can prevent airway inflammation by inhibiting the recruitment of inflammatory cells into the lungs (Vancheri *et al.* 2004). Furthermore, NOS-3-derived NO has been associated with airway inflammation blockade by inhibiting the expression of NOS-2 and production of inflammatory cytokines, including TNF- α (Thomassen *et al.* 1997, Cook *et al.* 2003, Ten Broeke *et al.* 2006).

The activation of ASM is classically considered to be regulated only through a paracrine signaling, but several pieces of evidence pointed out that hormones released by different organs, including adrenals, gonads, adipose tissue and pancreas, can affect ASM contractility. This endocrine regulation of ASM is important, since changes in the circulating levels of such hormones can inhibit or exacerbate the contraction of ASM in asthmatics (Bosse 2014). For instance, patients with type 1 diabetes who have high circulating levels of glucagon (Aronoff *et al.* 2004) had a lower incidence of asthma (Caffarelli *et al.* 2004, Karlstad *et al.* 2012). Our results could help explain, at least in part, a possible mechanism associated with this phenomenon.

In conclusion, our findings demonstrate that glucagon inhibits both smooth muscle spasms caused by cholinergic stimuli and AHR and lung inflammatory response induced by LPS. These effects seem to be associated with increased NOS-3 and COX-1 activation, with consequent production of NO and PGE₂ by epithelial cells. Taken together, these findings suggest glucagon as a possible new treatment for limited airflow resulting from human lung diseases.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

The research leading to these results has received funding from MCT/CNPq/CT-SAÚDE/MS/SCTIE/DECIT N° 42/2010 under grant agreement n° 563899/2010; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Programa de Auxílio à Pesquisa (PAPESVI/FIOCRUZ); and Ministério da Saúde, Brazil.

Author contribution statement

D B R I performed the research; analyzed the data; wrote the paper. J B D performed the research; analyzed the data. L P C performed the research;

analyzed the data. A R S performed the research; contributed essential reagents or tools; analyzed the data. P M R S designed the research study; contributed essential reagents or tools. M A M contributed essential reagents or tools; wrote the paper. V F C designed the research study; contributed essential reagents or tools; wrote the paper.

Acknowledgements

We thank Ana Carolina Santos de Arantes, Ana Lucia de Aguiar Pires, Daiana Cristina Oliveira dos Santos and Edson Fernandes de Assis from FIOCRUZ for their technical support.

References

- Altarejos JY & Montminy M 2011 CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **12** 141–151. (doi:10.1038/nrm3072)
- Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B & Want L 2004 Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum* **17** 183–190. (doi:10.2337/diaspect.17.3.183)
- Authier F & Desbuquois B 2008 Glucagon receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65** 1880–1899. (doi:10.1007/s00018-008-7479-6)
- Barnes PJ 1998 Pharmacology of airway smooth muscle. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **158** S123–S132. (doi:10.1164/ajrccm.158.supplement_2.13tac800)
- Billington CK, Ojo OO, Penn RB & Ito S 2013 cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **26** 112–120. (doi:10.1016/j.pupt.2012.05.007)
- Blumenthal MN & Brody TM 1969 Studies on the mechanism of drug-induced bronchiolar relaxation in the guinea pig. *Journal of Allergy* **44** 63–69. (doi:10.1016/0021-8707(69)90001-X)
- Bosse Y 2014 Endocrine regulation of airway contractility is overlooked. *Journal of Endocrinology* **222** R61–R73. (doi:10.1530/JOE-14-0220)
- Caffarelli C, Cavagni G, Pierdomenico R, Chiari G, Spattini A & Vanelli M 2004 Coexistence of IgE-mediated allergy and type 1 diabetes in childhood. *International Archives of Allergy and Immunology* **134** 288–294. (doi:10.1159/000079166)
- Coelho LP, Serra MF, Pires AL, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, dos Santos MH & Martins MA 2008 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **327** 206–214. (doi:10.1124/jpet.108.138032)
- Conarello SL, Jiang G, Mu J, Li Z, Woods J, Zycband E, Ronan J, Liu F, Roy RS, Zhu L *et al.* 2007 Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated β cell loss and hyperglycaemia. *Diabetologia* **50** 142–150. (doi:10.1007/s00125-006-0481-3)
- Cook S, Vollenweider P, Menard B, Egli M, Nicod P & Scherrer U 2003 Increased eNO and pulmonary iNOS expression in eNOS null mice. *European Respiratory Journal* **21** 770–773. (doi:10.1183/09031936.03.00121203)
- Cryer PE 2012 Minireview: glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* **153** 1039–1048. (doi:10.1210/en.2011-1499)
- Ferreira TP, de Arantes AC, do Nascimento CV, Olsen PC, Trentin PG, Rocco PR, Hogaboam CM, Puri RK, Martins MA & Silva PM 2013 IL-13 immunotoxin accelerates resolution of lung pathological changes triggered by silica particles in mice. *Journal of Immunology* **191** 5220–5229. (doi:10.4049/jimmunol.1203551)
- Folkerts G & Nijkamp FP 1998 Airway epithelium: more than just a barrier!. *Trends in Pharmacological Sciences* **19** 334–341. (doi:10.1016/S0165-6147(98)01232-2)

- Forstermann U, Boissel JP & Kleinert H 1998 Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB Journal* **12** 773–790.
- Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R & Tschop MH 2010 The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews. Endocrinology* **6** 689–697. (doi:10.1038/nrendo.2010.187)
- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG & Gelfand EW 1997 Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **156** 766–775. (doi:10.1164/ajrccm.156.3.9606031)
- Han EH, Kim HG, Hwang YP, Choi JH, Im JH, Park B, Yang JH, Jeong TC & Jeong HG 2010 The role of cyclooxygenase-2-dependent signaling via cyclic AMP response element activation on aromatase up-regulation by *o,p'*-DDT in human breast cancer cells. *Toxicology Letters* **198** 331–341. (doi:10.1016/j.toxlet.2010.07.015)
- Horvat SJ, Deshpande DA, Yan H, Panettieri RA, Codina J, DuBose TD Jr, Xin W, Rich TC & Penn RB 2012 A-kinase anchoring proteins regulate compartmentalized cAMP signaling in airway smooth muscle. *FASEB Journal* **26** 3670–3679. (doi:10.1096/fj.11-201020)
- Hsia BJ, Pastva AM, Giamberardino CD, Potts-Kant EN, Foster WM, Que LG, Abraham SN, Wright JR & Zaas DW 2012 Increased nitric oxide production prevents airway hyperresponsiveness in caveolin-1 deficient mice following endotoxin exposure. *Journal of Allergy & Therapy* (Supplement 1(4)) 1–18. (doi:10.4172/2155-6121.S1-004)
- Imbruce R, Goldfedder A, Maguire W, Briscoe W & Nair S 1975 The effect of glucagon on airway resistance. *Journal of Clinical Pharmacology* **15** 680–684. (doi:10.1002/j.1552-4604.1975.tb05920.x)
- Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K, Suki B & Naruse K 2006 Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle. *European Journal of Pharmacology* **552** 135–142. (doi:10.1016/j.ejphar.2006.08.067)
- Jones BJ, Tan T & Bloom SR 2012 Minireview: glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* **153** 1049–1054. (doi:10.1210/en.2011-1979)
- Karlstad O, Nafstad P, Tverdal A, Skurtveit S & Furu K 2012 Comorbidities in an asthma population 8–29 years old: a study from the Norwegian Prescription Database. *Pharmacoeconomics and Drug Safety* **21** 1045–1052. (doi:10.1002/pds.2233)
- Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, Unson CG, Williams R, Lee NH, Ceryak S & Bouscarel B 2011 Dual mode of glucagon receptor internalization: role of PKC α , GRKs and β -arrestins. *Experimental Cell Research* **317** 2981–2994. (doi:10.1016/j.yexcr.2011.10.001)
- Leibiger B, Moede T, Muhandiramlage TP, Kaiser D, Vaca Sanchez P, Leibiger IB & Berggren PO 2012 Glucagon regulates its own synthesis by autocrine signaling. *PNAS* **109** 20925–20930. (doi:10.1073/pnas.1212870110)
- Maarsingh H, Tio MA, Zaagsma J & Meurs H 2005 Arginase attenuates inhibitory nonadrenergic noncholinergic nerve-induced nitric oxide generation and airway smooth muscle relaxation. *Respiratory Research* **6** 23. (doi:10.1186/1465-9921-6-23)
- Melanson SW, Bonfante G & Heller MB 1998 Nebulized glucagon in the treatment of bronchospasm in asthmatic patients. *American Journal of Emergency Medicine* **16** 272–275. (doi:10.1016/S0735-6757(98)90100-0)
- Mentlein R 2009 Mechanisms underlying the rapid degradation and elimination of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* **23** 443–452. (doi:10.1016/j.beem.2009.03.005)
- Molloy ES, Morgan MP, Doherty GA, McDonnell B, Hilliard M, O'Byrne J, Fitzgerald DJ & McCarthy GM 2008 Mechanism of basic calcium phosphate crystal-stimulated cyclo-oxygenase-1 up-regulation in osteoarthritic synovial fibroblasts. *Rheumatology* **47** 965–971. (doi:10.1093/rheumatology/ken144)
- Oguma T, Kume H, Ito S, Takeda N, Honjo H, Kodama I, Shimokata K & Kamiya K 2006 Involvement of reduced sensitivity to Ca in β -adrenergic action on airway smooth muscle. *Clinical and Experimental Allergy* **36** 183–191. (doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02412.x)
- Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM & Martins MA 2012 Two for one: cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *European Journal of Pharmacology* **680** 102–107. (doi:10.1016/j.ejphar.2012.01.040)
- Quesada I, Tuduri E, Ripoll C & Nadal A 2008 Physiology of the pancreatic α -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology* **199** 5–19. (doi:10.1677/JOE-08-0290)
- Qureshi SA, Rios Candelore M, Xie D, Yang X, Tota LM, Ding VD, Li Z, Bansal A, Miller C, Cohen SM *et al.* 2004 A novel glucagon receptor antagonist inhibits glucagon-mediated biological effects. *Diabetes* **53** 3267–3273. (doi:10.2337/diabetes.53.12.3267)
- Radi ZA, Meyerholz DK & Ackermann MR 2010 Pulmonary cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 cellular expression and distribution after respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infection. *Viral Immunology* **23** 43–48. (doi:10.1089/vim.2009.0042)
- Rosciioni SS, Maarsingh H, Elzinga CR, Schuur J, Menzen M, Halayko AJ, Meurs H & Schmidt M 2011 Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15** 1551–1563. (doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01150.x)
- Schlemper V, Medeiros R, Ferreira J, Campos MM & Calixto JB 2005 Mechanisms underlying the relaxation response induced by bradykinin in the epithelium-intact guinea-pig trachea *in vitro*. *British Journal of Pharmacology* **145** 740–750. (doi:10.1038/sj.bjp.0706222)
- Serra MF, Anjos-Valotta EA, Olsen PC, Couto GC, Jurgilas PB, Cotias AC, Pao CR, Ferreira TP, Arantes AC, Pires AL *et al.* 2012 Nebulized lidocaine prevents airway inflammation, peribronchial fibrosis, and mucus production in a murine model of asthma. *Anesthesiology* **117** 580–591. (doi:10.1097/ALN.0b013e31826687d5)
- Sherman MS, Lazar EJ & Eichacker P 1988 A bronchodilator action of glucagon. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **81** 908–911. (doi:10.1016/0091-6749(88)90949-9)
- de Sousa AA, Soares PM, de Almeida AN, Maia AR, de Souza EP & Assreuy AM 2010 Antispasmodic effect of Mentha piperita essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *Journal of Ethnopharmacology* **130** 433–436. (doi:10.1016/j.jep.2010.05.012)
- Steiner AA, Li S, Llanos QJ & Blatteis CM 2001 Differential inhibition by nimesulide of the early and late phases of intravenous- and intracerebroventricular-LPS-induced fever in guinea pigs. *Neuroimmunomodulation* **9** 263–275. (doi:10.1159/000054289)
- Strapkova A & Antosova M 2011 Competition of NO synthases and arginase in the airways hyperreactivity. *General Physiology and Biophysics* **30** 75–83. (doi:10.4149/gpb_2011_01_75)
- Ten Broeke R, De Crom R, Van Haperen R, Verweij V, Leusink-Muis T, Van Ark I, De Clerck F, Nijkamp FP & Folkerts G 2006 Overexpression of endothelial nitric oxide synthase suppresses features of allergic asthma in mice. *Respiratory Research* **7** 58. (doi:10.1186/1465-9921-7-58)
- Thomassen MJ, Buhrow LT, Connors MJ, Kaneko FT, Erzurum SC & Kavuru MS 1997 Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **17** 279–283. (doi:10.1165/ajrcmb.17.3.2998m)
- Udem BJ, Ellis JL, Meeker S, Fischer A & Canning BJ 1996 Inhibition by zinc protoporphyrin-IX of vasoactive intestinal peptide-induced relaxations of guinea pig isolated trachea. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **278** 964–970.
- Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA & Crimi N 2004 The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE₂. *Trends in Immunology* **25** 40–46. (doi:10.1016/j.it.2003.11.001)
- Vieira AB, Coelho LP, Insuela DB, Carvalho VF, Dos Santos MH, Silva PM & Martins MA 2013 Mangiferin prevents guinea pig tracheal contraction via activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *PLoS ONE* **8** e71759. (doi:10.1371/journal.pone.0071759)
- Wilber ST, Wilson JE, Blanda M, Gerson LW, Meerbaum SO & Janas G 2000 The bronchodilator effect of intravenous glucagon in asthma

exacerbation: a randomized, controlled trial. *Annals of Emergency Medicine* **36** 427–431. (doi:10.1016/S0196-0644(00)44407-0)

Zhang XP & Hintze TH 2006 cAMP signal transduction induces eNOS activation by promoting PKB phosphorylation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **290** H2376–H2384. (doi:10.1152/ajpheart.00614.2005)

Zieba BJ, Artamonov MV, Jin L, Momotani K, Ho R, Franke AS, Nepl RL, Stevenson AS, Khromov AS, Chrzanowska-Wodnicka M *et al.* 2011 The cAMP-responsive Rap1 guanine nucleotide exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity. *Journal of Biological Chemistry* **286** 16681–16692. (doi:10.1074/jbc.M110.205062)

Received in final form 13 April 2015

Accepted 30 April 2015

Mangiferin Prevents Guinea Pig Tracheal Contraction via Activation of the Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway

Aline B. Vieira¹, Luciana P. Coelho¹, Daniella B. R. Insuela¹, Vinicius F. Carvalho¹, Marcelo H. dos Santos², Patricia M.R. Silva¹, Marco A. Martins^{1*}

1 Laboratory of Inflammation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **2** Laboratory of Phytochemistry and Medicinal and Chemistry, Department of Pharmacy, Alfenas, Federal University of Alfenas, MG, Brazil

Abstract

Previous studies have described the antispasmodic effect of mangiferin, a natural glucoside xanthone (2-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone) that is present in mango trees and other plants, but its mechanism of action remains unknown. The aim of this study was to examine the potential contribution of the nitric oxide-cyclic GMP pathway to the antispasmodic effect of mangiferin on isolated tracheal rings preparations. The functional effect of mangiferin on allergic and non-allergic contraction of guinea pig tracheal rings was assessed in conventional organ baths. Cultured tracheal rings were exposed to mangiferin or vehicle, and nitric oxide synthase (NOS) 3 and cyclic GMP (cGMP) levels were quantified using western blotting and enzyme immunoassays, respectively. Mangiferin (0.1–10 μ M) inhibited tracheal contractions induced by distinct stimuli, such as allergen, histamine, 5-hydroxytryptamine or carbachol, in a concentration-dependent manner. Mangiferin also caused marked relaxation of tracheal rings that were precontracted by carbachol, suggesting that it has both anti-contraction and relaxant properties that are prevented by removing the epithelium. The effect of mangiferin was inhibited by the nitric oxide synthase inhibitor, N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (100 μ M), and the soluble guanylate cyclase inhibitor, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (10 μ M), but not the adenylate cyclase inhibitor, 9-(tetrahydro-2-furyl)adenine (SQ22536) (100 μ M). The antispasmodic effect of mangiferin was also sensitive to K⁺ channel blockers, such as tetraethylammonium (TEA), glibenclamide and apamin. Furthermore, mangiferin inhibited Ca²⁺-induced contractions in K⁺ (60 mM)-depolarised tracheal rings preparations. In addition, mangiferin increased NOS3 protein levels and cGMP intracellular levels in cultured tracheal rings. Finally, mangiferin-induced increase in cGMP levels was abrogated by co-incubation with either ODQ or L-NAME. These data suggest that the antispasmodic effect of mangiferin is mediated by epithelium-nitric oxide- and cGMP-dependent mechanisms.

Citation: Vieira AB, Coelho LP, Insuela DBR, Carvalho VF, dos Santos MH, et al. (2013) Mangiferin Prevents Guinea Pig Tracheal Contraction via Activation of the Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway. PLoS ONE 8(8): e71759. doi:10.1371/journal.pone.0071759

Editor: Dominique Heymann, Faculté de médecine de Nantes, France

Received: December 21, 2012; **Accepted:** July 3, 2013; **Published:** August 8, 2013

Copyright: © 2013 Vieira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013) under grant agreement no. HEALTH-F4-2011-281608, and from National Institute of Science and Technology-INOFAR under grant agreement no.573.564/2008-6. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mmartins@ioc.fiocruz.br

Introduction

The xanthone mangiferin is an active phytochemical compound with therapeutic potential that is primarily found in mango tree leaves and stem bark (*Mangifera indica*) [1,2]. This substance usually occurs as a glucoside and is also found in a variety of other plant families, including *Anemarrhena asphodeloides* [3], *Bersama abyssinica* [4], *Cyclopia genistoides* [5], *Cyclopia subternata* [6], *Gentiana lutea* [7], *Gnidia involucreta* [8], *Rhizoma belamcandae* [9] and *Salacia oblonga* [10], among others. Notably, *M. indica* and several of the above listed plants have been traditionally used to treat important human diseases, such as diabetes [10], obesity [10], cancer [11], and asthma [12].

An extract obtained via the decoction and drying of mango stem bark was developed at industrial scale in Cuba for use as a nutritional supplement and phytomedicine [13]. Vimang[®] is the brand name of this commercial preparation, and it contains a standardised mixture of terpenoids, steroids, fatty acids and polyphenols, including phenolic acids, phenolic esters and the predominant component mangiferin [13].

Similar to other polyphenol compounds, such as anthocyanins, curcumin and resveratrol, mangiferin has a broad spectrum of pharmacological effects. The most prominent and best-studied property of this class of phytochemicals is their antioxidant activity [1,14]. The ability to scavenge and decrease the formation of reactive oxygen species, as well as to activate enzymatic antioxidant systems, seems to be crucial for the outstanding antioxidant activity of mangiferin [1,14,15]. Apart from its capacity to interfere with oxidative stress, mangiferin exhibits a number of other properties, including immune-modulatory [16–18], anti-inflammatory [19–21] and anti-cancer [11,22,23] activities, suggesting that this substance could be used as a molecular template for innovative therapeutic applications.

The free radical nitric oxide is a neurotransmitter of the inhibitory nonadrenergic noncholinergic respiratory system [24,25]. It is produced by neural fibres that innervate airway smooth muscle cells, epithelial ciliated cells, type II alveolar cells and macrophages, and nitric oxide has been described as an effective antispasmodic mediator in the airway [26]. The molecular mechanism underlying the antispasmodic effect of

nitric oxide is the direct activation of soluble guanylate cyclase and subsequent elevation of intracellular cGMP levels [27].

The aim of the present study was to assess the potential protective effect of mangiferin on the contractile response presented by the rat tracheal smooth muscle, following exposure to distinct pro-spasmodic agents, such as histamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT), carbachol and allergen *in vitro*. All these spasmogens are supposed to play important role in the pathogenesis of airway obstruction noted in atopic asthmatics. Indeed, earlier investigations have shown that *M. indica* stem bark aqueous extract is an effective inhibitor of rat tracheal contraction caused by acetylcholine [28,29] and histamine [29]. However, exactly how the extract is acting to induce anti-contraction effects and whether or not this effect is accounted for by mangiferin has not been studied. Furthermore, our intention with this study was to test the hypothesis that mangiferin might be acting as an antispasmodic agent via activation of the nitric oxide-cGMP pathway. The results show that mangiferin can indeed inhibit smooth muscle spasms triggered by immunological and non-immunological stimuli. Such an effect is associated with nitric oxide production by epithelial cells, up-regulation of intracellular cGMP and the opening of K^+_{ATP} and small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in airway smooth muscle cells.

Methods

Ethics Statement

Experimental conditions and procedures involving animals were performed with direct approval of the Committee on Use of Laboratory Animals of the Oswaldo Cruz Foundation under license no. CEUA-FIOCRUZ 00085-01.

Animals

Male guinea pigs (300–400 g) were obtained from the Oswaldo Cruz Foundation breeding unit (Rio de Janeiro, Brazil). They were housed under conditions of constant temperature and controlled illumination, and food and water were available *ad libitum*.

Drugs and Chemical Reagents

Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$), magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Mangiferin, Glucose, EGTA, histamine, 5-hydroxytryptamine (5-HT), ovalbumin, carbachol, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), tetraethylammonium (TEA), glibenclamide, apamin and 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All solutions were freshly prepared in distilled water or DMSO (final concentration, 0.1%) immediately before use.

Isolated Tracheal Preparation and Measurement of Tension

Guinea pigs used for anaphylactic contraction assays were presensitised with a subcutaneous injection of 0.2 ml of a suspension containing ovalbumin (50 μ g) and $Al(OH)_3$ (5 mg). The animals were sacrificed in a CO_2 atmosphere 14 days after sensitisation, and their tracheal segments were removed and quickly immersed in Krebs' nutritional solution (118 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 24 mM $NaHCO_3$, and 11 mM glucose). Adhering fat and connective tissue were dissected away from the trachea, and the trachea was then cut into rings. The tracheal rings were

mounted in isolated organ baths filled with 10 ml of Krebs' solution, maintained at 37°C, and aerated with 95% O_2 and 5% CO_2 . To achieve a steady spontaneous tone level, an initial tension of 1 g was applied. Contractions were measured with an isometric force-displacement transducer (Ugo Basile, Comerio, Italy) and recorded by an Isolated Organs Data Acquisition program (Proto5; Leticia Scientific Instruments, Barcelona, Spain).

Protocols for Measurement of Tension Development

The experimental protocols were previously described [30]. Briefly, the tracheal rings were allowed to stabilise for 60 min, whereas the bathing solution was exchanged at 10 min intervals. At the end of the equilibration period, isolated tracheal rings, in absence or presence of epithelium, were contracted with carbachol (2.5 μ M), and once the contractions had reached a plateau, various concentrations of vehicle (DMSO) or mangiferin (0.1–1000 μ M) were added. All relaxations are expressed as the percentage of the maximal carbachol-induced contractile responses.

We also investigated the spasmolytic effect of mangiferin on isolated tracheal rings. At the end of the equilibration period, the response to carbachol (2.5 μ M) was recorded. After carbachol was washed out and a stable baseline tone was re-established, the tissues were exposed to carbachol (0.01–100 μ M), histamine (0.1–1000 μ M), 5-HT (0.01–30 μ M), or antigen (ovalbumin; 0.001–100 μ g/ml) in the presence or absence of mangiferin (0.1–10 μ M). The preparations were pre-incubated with mangiferin for 15 min before the addition of each spasmogen. All responses were expressed as a percentage of the initial response to 2.5 μ M carbachol. In some experiments, the epithelial cells were removed mechanically by rubbing the internal tracheal surface with a fine silver wire (200 μ m in diameter), as described previously [31]. During the experiment, the contractile response to carbachol (0.01–100 μ M) was measured before and after exposing intact or denuded epithelium tracheal rings to 10 μ M mangiferin for 15 min.

To evaluate the putative interference of mangiferin with calcium influx, Ca^{2+} concentration-response curves were established. Briefly, the responses of tracheal ring segments from naive guinea pig to 2.5 μ M carbachol were recorded. After the carbachol was washed out and a stable baseline tone was re-established, the tissues were exposed to successive cycles of 60 mM KCl stimulations/washouts in Ca^{2+} -free Krebs' solution containing 2 mM EGTA until complete desensitisation to the 60 mM KCl-evoked contractile response was achieved. Next, the tracheal rings were immersed in Ca^{2+} -free Krebs' solution containing 60 mM KCl, and the extracellular Ca^{2+} concentration was increased stepwise by the cumulative addition of $CaCl_2$ (0.01–30 mM), in the presence or absence of mangiferin (0.1–10 μ M) or vehicle (0.1% DMSO). All responses were expressed as a percentage of response to 2.5 μ M carbachol.

To further investigate the mechanisms of action of mangiferin, the tracheal rings were pretreated 10 min before mangiferin application with 10 μ M ODQ, an inhibitor of guanylate cyclase; 100 μ M L-NAME, an inhibitor of NOS; 100 μ M SQ22536, an inhibitor of adenylate cyclase; 10 μ M TEA, a nonselective K^+ channel blocker; 1 μ M glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker or 1 μ M apamin, Ca^{2+} -dependent K^+ channel blocker of small conductance. All responses were expressed as a percentage of the response to 2.5 μ M carbachol.

Western Blotting for NOS3

Three pools of three rat tracheas were incubated with 10 μ M mangiferin or vehicle (0.1% DMSO) for 15 min., and then

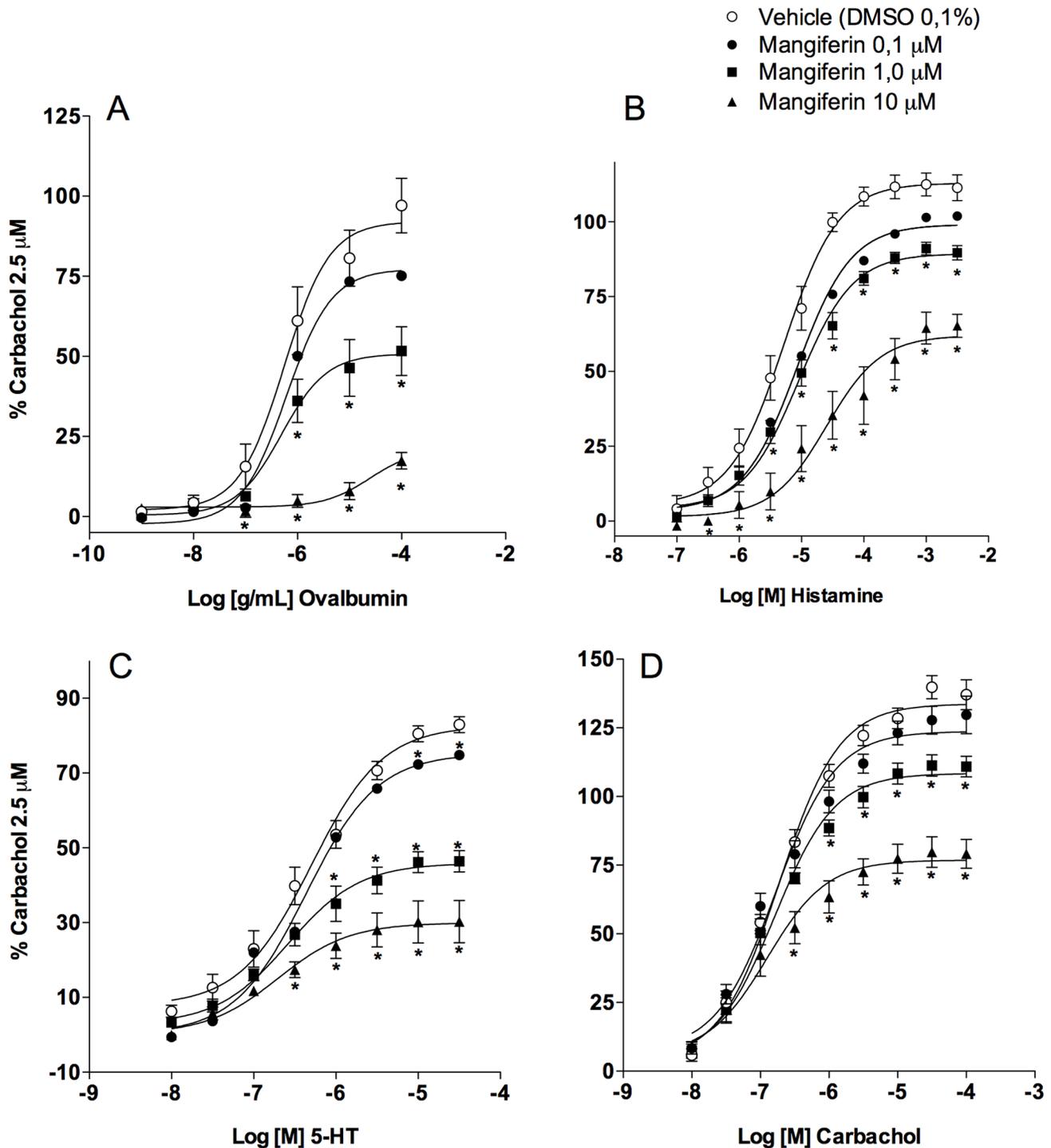


Figure 1. Mangiferin inhibits allergen- and spasmogen-induced tracheal contractions. The antispasmodic effects of mangiferin (0.1–10 μM) on guinea pig tracheal contraction induced by ovalbumin (0.001–100 μg/ml) (A), histamine (0.1–3000 μM) (B), 5-HT (0.01–30 μM) (C) or carbachol (0.01–100 μM) (D). Each point represents the mean \pm S.E.M. of 4 to 8 segments. All results are expressed as a percentage of the contractile response induced by 2.5 μM carbachol. * $p < 0.05$ compared with the tracheal responses of vehicle-treated tissues (open circles). doi:10.1371/journal.pone.0071759.g001

homogenized in ice cold lysis buffer containing the protease inhibitor cocktail Complete (F.Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) and 0.1% Triton X-100 in PBS. The lysate was centrifuged at $13,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Supernatant was recovered and protein concentration was determined using the

BCA assay (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, USA). Equal amounts of sample protein (100 μg/lane) were separated by SDS-PAGE using polyacrylamide gels and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Nonspecific binding was blocked with 5% (w/v) skimmed milk

Table 1. Potency (pEC_{50}) and maximal response (E_{MAX}) values obtained from concentration-response curves of allergen (ovalbumin, 0.001–100 $\mu\text{g/ml}$), histamine (0.1–3000 μM), 5-HT (0.01–30 μM) or carbachol challenge (0.01–100 μM) in guinea pig tracheal rings, following co-incubation with mangiferin (0.1–10 μM) or vehicle (0.1% DMSO).

Mangiferin (μM)	Ovalbumin		Histamine		5-HT		Carbachol	
	pEC_{50}	E_{MAX} (%)	pEC_{50}	E_{MAX} (%)	pEC_{50}	E_{MAX} (%)	pEC_{50}	E_{MAX} (%)
0 (vehicle)	6.08 \pm 0.20	97.1 \pm 8.5	5.53 \pm 0.12	111.3 \pm 4.3	6.15 \pm 0.14	82.9 \pm 2.1	7.12 \pm 0.06	137.1 \pm 2.1
0.1	5.78 \pm 0.13	75.1 \pm 6.2	5.11 \pm 0.10*	101.9 \pm 2.6	5.93 \pm 0.04	74.8 \pm 2.5	7.13 \pm 0.09	129.7 \pm 2.5
1.0	4.73 \pm 0.44*	51.6 \pm 7.6**	4.95 \pm 0.10**	89.7 \pm 2.4**	5.06 \pm 0.17**	46.4 \pm 2.8	6.97 \pm 0.06	110.9 \pm 3.7
10.0	3.33 \pm 0.09***	17.4 \pm 2.6***	3.70 \pm 0.34***	65.2 \pm 3.9***	4.44 \pm 0.19**	30.3 \pm 5.7	6.52 \pm 0.20*	79.1 \pm 5.3***

Data represent the mean \pm S.E.M. of 4 to 8 tracheal segments.

* $p < 0.05$,

** $p < 0.01$ and.

*** $p < 0.001$ compared with the tracheal responses of vehicle-treated tissues.

doi:10.1371/journal.pone.0071759.t001

powder in TTBS for 1 h followed by incubation with rabbit polyclonal antibody NOS3 (1: 500; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or mouse monoclonal antibody β -actin (1: 1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) overnight at 4°C. Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibody (1: 10,000, R&D Systems, MN, USA) for 1 h at room temperature. The membranes were washed in TTBS and protein expression was detected using enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA). Bands intensity was quantified by densitometry (Image-Pro® Plus Media Cybernetics, Bethesda, MD).

Measurement of cGMP

Intracellular cGMP concentrations in guinea pig tracheal rings were assayed as described previously [30]. Isolated tracheas were cut into rings, quickly immersed in Krebs' nutritional solution, and incubated with mangiferin (0.1–10 μM), L-NAME (100 μM) or ODQ (10 μM) in the presence of 100 μM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) for 20 min. Some tracheal rings were pretreated with 100 μM L-NAME or 10 μM ODQ for 10 min before the addition of 10 μM mangiferin. Tissue sections were rapidly frozen in liquid nitrogen, and the frozen tracheal rings were homogenised in ice-cold 6% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at 2000 \times g for 15 min at 4°C. To remove TCA, the supernatants were washed 4 times with 5 volumes of water-saturated diethyl ether. The top ether layer was discarded after each wash. Then, the supernatants were lyophilised, and the cGMP of each sample was determined using commercially available enzyme immunoassay kits (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean \pm S.E.M. EC_{50} values were calculated by fitting the log (agonist) vs. normalised response using GraphPad Software, and the results are displayed as the negative logarithm (pEC_{50}). Significant differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls test. P values of 0.05 or less were considered to be statistically significant.

Results

Mangiferin Prevents Allergen-, Histamine-, 5-HT- and Carbachol-induced Tracheal Contraction

It was previously reported that the aqueous extract of *M. indica*, of which mangiferin is the major active constituent [1], inhibited acetylcholine- or histamine-induced rat tracheal contractions [28,29]. To better characterise the putative antispasmodic property of mangiferin, we first investigated its ability to inhibit the anaphylactic contraction of tracheal rings obtained from ovalbumin-sensitised guinea pigs. The cumulative addition of ovalbumin (0.001–100 $\mu\text{g/ml}$) led to concentration-dependent contractile responses with a pEC_{50} of 6.08 \pm 0.20 and a maximal effect (E_{max}) of 97.1 \pm 8.5% (mean \pm S.E.M) ($n = 6$). Pretreatment with mangiferin (0.1–10 μM) for 15 min prior to the addition of cumulative concentrations of ovalbumin inhibited anaphylactic contractions in a concentration-dependent manner (Figure 1A). Furthermore, mangiferin (0.1 μM , 1 μM and 10 μM) affected both the potency and maximal response to ovalbumin, causing rightward shifts of 2-, 22- and 562-fold, respectively (Table 1). Next, tracheal rings from naïve guinea pigs were used to demonstrate that the contraction elicited by cumulative concentrations of distinct spasmogens, such as histamine (Figures 1B), 5-HT (Figure 1C) or carbachol (Figure 1D), were also inhibited by mangiferin in a concentration-dependent manner. As shown in Table 1, 1 μM and 10 μM mangiferin caused rightward shifts of 3.8- and 67.6-fold for histamine, 12.3- and 51.3-fold for 5-HT and 1.4- and 4-fold for carbachol, respectively. At these concentrations, mangiferin also reduced the maximal response to histamine (from 111 \pm 4% ($n = 7$) to 90 \pm 2% ($p < 0.01$, $n = 6$) and 65 \pm 4% ($p < 0.001$, $n = 5$)), 5-HT (from 83 \pm 2% ($n = 5$) to 46 \pm 3% ($p < 0.01$, $n = 6$) and 30 \pm 6% ($p < 0.001$, $n = 8$)) and carbachol (from 137 \pm 2% ($n = 6$) to 111 \pm 4% ($n = 7$) and 79 \pm 5% ($p < 0.001$, $n = 7$)).

Epithelial Removal Impairs the Anti-Spasmodic Effect of Mangiferin

Next, we examined whether the epithelium is involved in the effect of mangiferin by mechanically removing the epithelial cells from the internal tracheal surface with a fine silver wire, as previously reported [31]. Histological examination confirmed that the epithelial layer was removed (data not shown). The relaxant effect of mangiferin on carbachol pre-contracted tracheal segments (Figure 2A) was abolished following epithelial removal (Figure 2B). Similarly, the ability of mangiferin to impair carbachol-induced

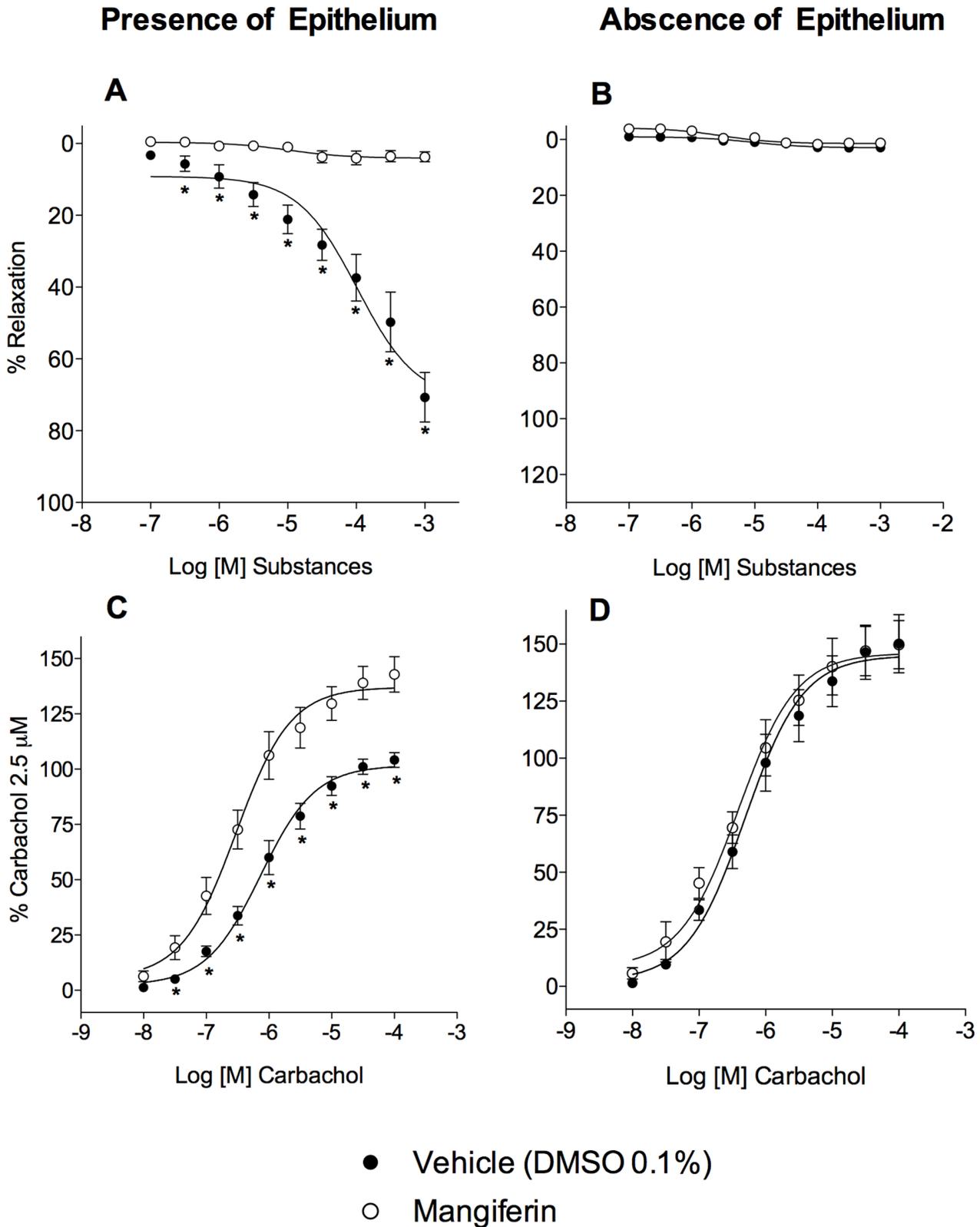


Figure 2. Involvement of the epithelium in the protective effect of mangiferin. Tracheal relaxations induced by cumulative concentrations of mangiferin in guinea-pig trachea that were precontracted with 2.5 μM carbachol in the presence (A) or absence (B) of epithelium. The antispasmodic effect of 10 μM mangiferin on tracheal contractions induced by carbachol (0.01–100 μM) in the presence (C) or absence (D) of epithelium. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 5 to 6 segments. All results are expressed as a percentage of the contractile response induced by 2.5 μM carbachol. * $p < 0.05$ compared with the tracheal responses of vehicle-treated tissues (open circles). doi:10.1371/journal.pone.0071759.g002

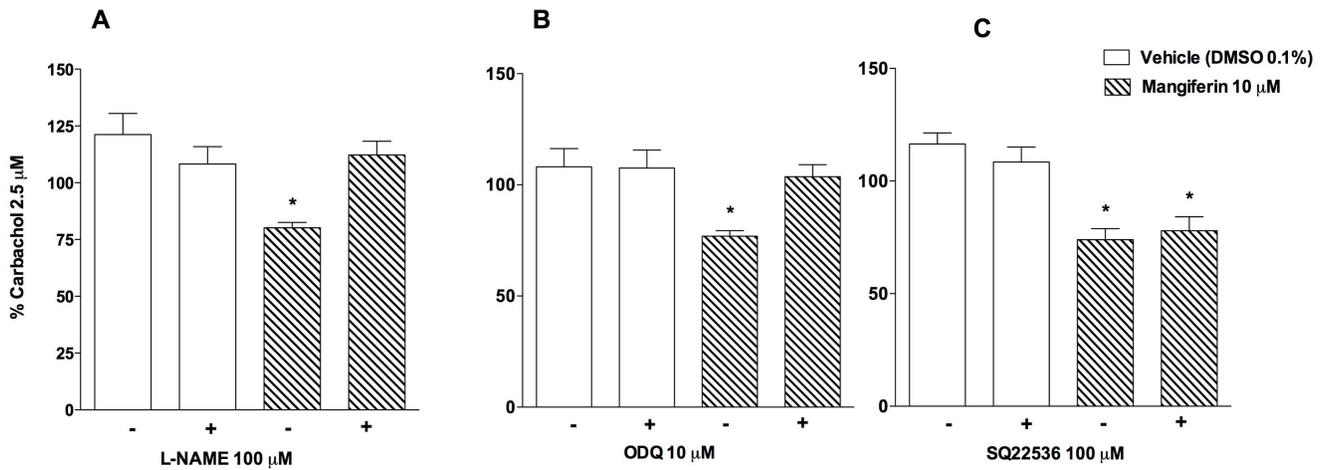


Figure 3. Involvement of nitric oxide in the antispasmodic effect of mangiferin. Effects of mangiferin (10 μM) on carbachol-contracted guinea pig trachea, performed in absence or presence of L-NAME (A), ODQ (B), or SQ22536 (C). Each point represents the mean ± S.E.M. of 6 segments. All results are expressed as a percentage of the contractile response induced by 2.5 μM carbachol. **p*<0.05 compared with tracheal responses of vehicle-treated tissues. doi:10.1371/journal.pone.0071759.g003

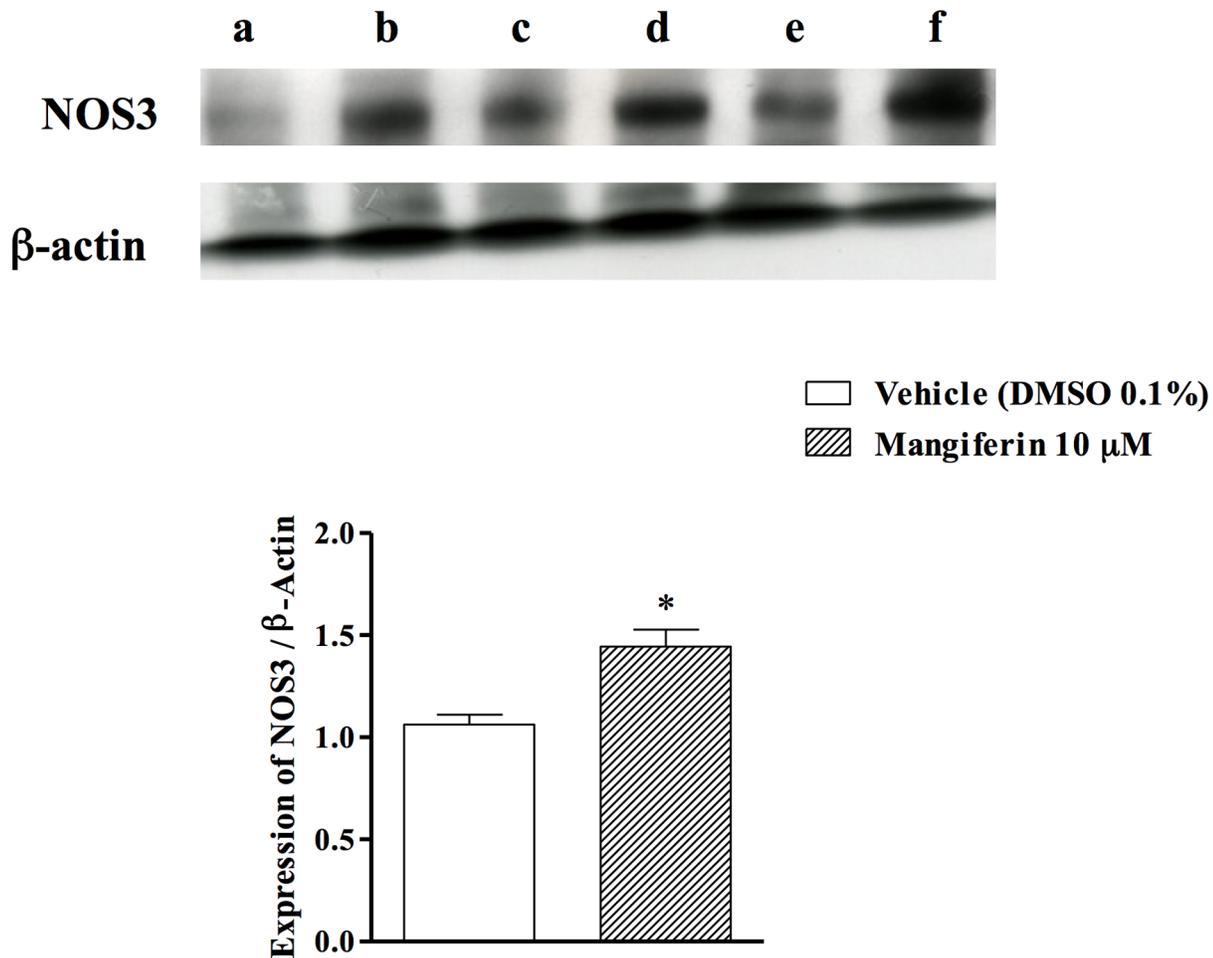


Figure 4. Mangiferin-induced up-regulation of NOS3 in cultured tracheas. Expression of NOS3 in rat tracheas was determined by Western blot. a, c and e are lanes of trachea pools incubated with vehicle, while b, d and e are lanes of trachea pools incubated with mangiferin for 15 min. Data were normalized to β-actin and represented as the ratio between expression of NOS3:β-actin. Each bar represents the mean ± S.E.M. of 3 pools containing 3 tracheas each. * *p*<0.05 as compared with vehicle-treated groups. doi:10.1371/journal.pone.0071759.g004

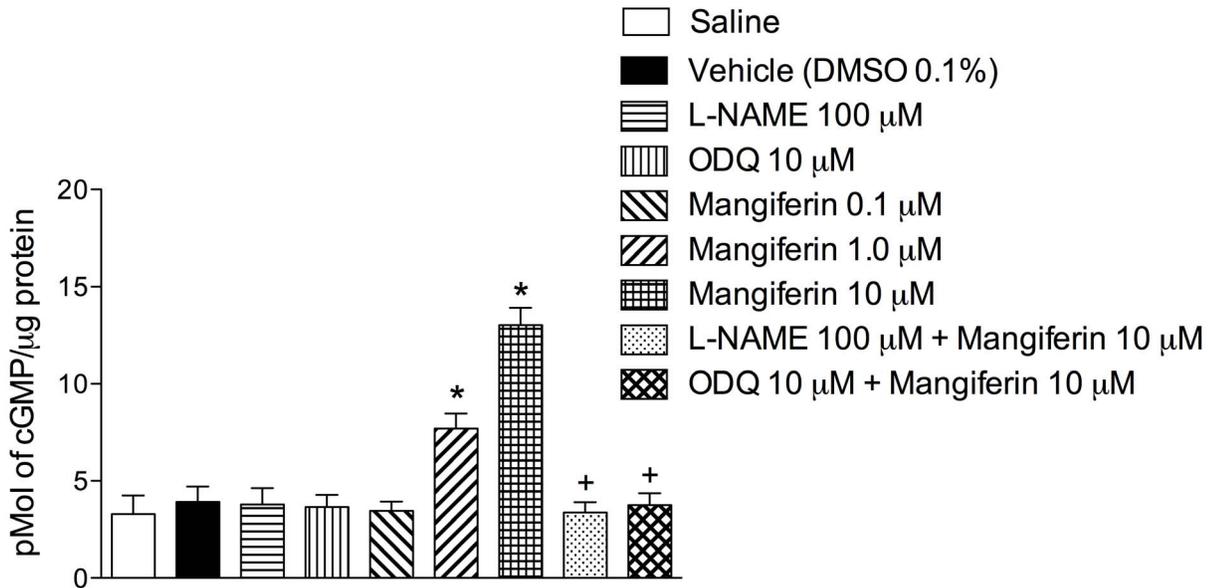


Figure 5. Mangiferin increases cGMP levels in cultured tracheal rings. Effect of mangiferin on tracheal cGMP levels in the presence or absence of L-NAME or ODQ. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 4 segments. * $p < 0.05$ compared with vehicle-treated tissues. + $p < 0.05$ compared with 10 μ M mangiferin-treated tissues. doi:10.1371/journal.pone.0071759.g005

contraction (Figure 2C) was abolished after epithelial denudation (Figure 2D).

Inhibition of NOS or Guanylate Cyclase Prevents the Anti-Spasmodic Effect of Mangiferin

Tracheal rings were pretreated with the NOS inhibitor, L-NAME (100 μ M), to examine the role of nitric oxide-mediated signalling in the antispasmodic effect of mangiferin. As shown in figure 3A, L-NAME prevented the relaxing effect of mangiferin

after carbachol-induced tracheal contraction. This response was also abrogated by pre-incubation with the soluble guanylate cyclase inhibitor, ODQ (10 μ M) (Figure 3B), whereas pretreatment with the adenylate cyclase inhibitor, SQ22536 (100 μ M), did not alter the protective effect of mangiferin (Figure 3C).

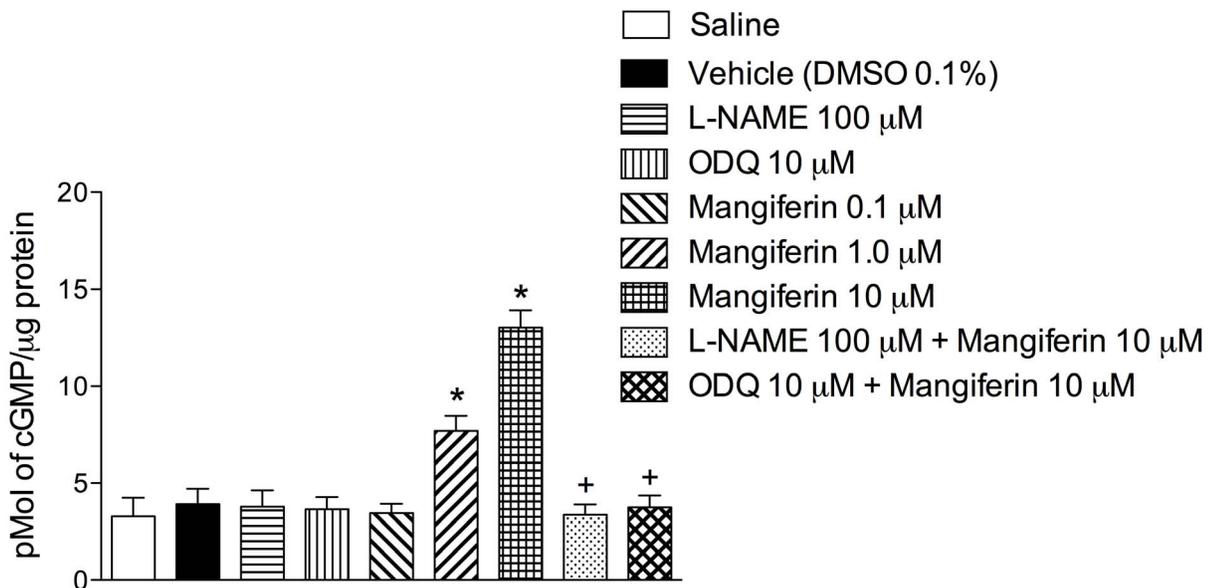


Figure 6. Involvement of K⁺ channels in the antispasmodic effect of mangiferin. Effects of mangiferin (10 μ M) on carbachol-contracted guinea pig trachea, performed in the presence or absence of TEA (A), glibenclamide (B) or apamin (C). Each point represents the mean \pm S.E.M. of 6 segments. All results are expressed as a percentage of the contractile response induced by 2.5 μ M carbachol. * $p < 0.05$ compared with vehicle-treated tissues. doi:10.1371/journal.pone.0071759.g006

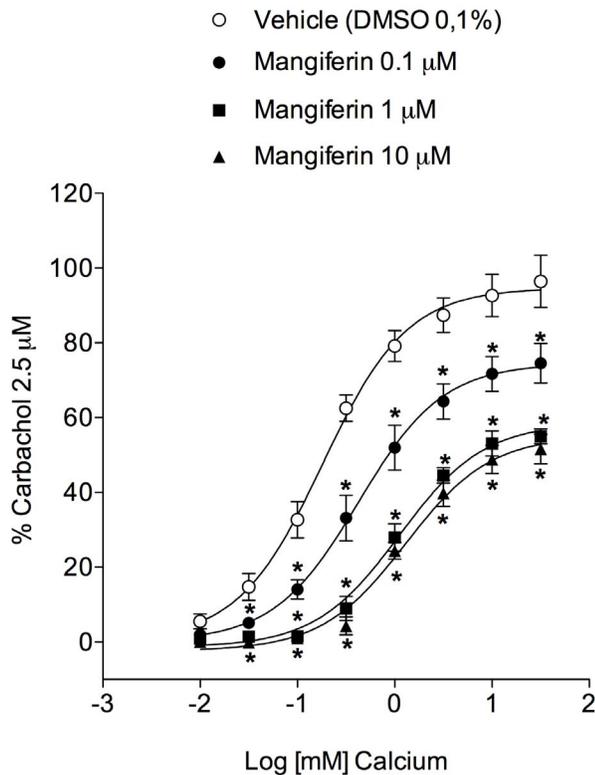


Figure 7. Involvement of Voltage-dependent calcium channels in the protective effect of mangiferin. Effect of mangiferin (0.01–10 μM) on the contractile response triggered after the cumulative application of calcium to tracheal rings mounted in calcium-free high K^+ (60 mM) Krebs' solution. Each point represents the mean \pm S.E.M. from 6 segments. The magnitude of the contractile tension induced by calcium on tracheal preparations is expressed as a percentage of the contractile response evoked by 2.5 μM carbachol. * $p < 0.05$ compared with vehicle-treated tissues.
doi:10.1371/journal.pone.0071759.g007

Mangiferin Increases NOS3 Expression in Cultured Tracheal Rings

To determine whether NOS3 isoform was up-regulated by mangiferin treatment, western blotting analyses were performed on tracheal tissue homogenates. We found that constitutive NOS3 expression was significantly increased in cultured tracheal rings exposed to 10 μM mangiferin, as compared to vehicle exposed rings (Figure 4).

Mangiferin Increases cGMP Levels in Cultured Tracheal Rings

Next, we demonstrated that mangiferin (0.1–10 μM) up-regulated the levels of cGMP in cultured guinea pig tracheal rings in a concentration-dependent manner (Figure 5). The ability of mangiferin to elevate cGMP levels was abolished by pre-incubation with either 100 μM L-NAME or 10 μM ODQ (Figure 5).

K^+ Channel Blockers Reduce the Antispasmodic Effect of Mangiferin

Prior studies revealed that the opening of K^+ channels leads to K^+ efflux, hyperpolarisation and relaxation of respiratory smooth muscle [32]. The nonselective K^+ channel blocker TEA (10 μM), the K^+_{ATP} channel blocker glibenclamide (1 μM) and the small-

conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel blocker apamin (1 μM) were utilised to assess the potential role of K^+ channels in the antispasmodic activity of mangiferin. The ability of individual K^+ channel blockers to interfere with the protective effect of 10 μM mangiferin was evaluated in epithelia-preserved guinea pig tracheas that were stimulated with 2.5 μM carbachol. We found that a 15-min preincubation with TEA (Figure 6A), glibenclamide (Figure 6B) or apamin (Figure 6C), prior to the application of mangiferin, prevented the antispasmodic effect of this compound.

Mangiferin Inhibits Ca^{2+} -Induced Contraction in K^+ -Depolarised Trachea Rings

Airway smooth muscle contraction is, in large part, regulated by intracellular Ca^{2+} . Thus, we wanted to assess the effect of mangiferin on extracellular Ca^{2+} -induced tracheal tension using the classical system of isolated organ bath preparations maintained in Ca^{2+} -free medium and depolarised with 60 mM KCl [33]. As expected, when the extracellular Ca^{2+} concentration was increased stepwise by the cumulative addition of CaCl_2 (0.01–30 mM), we observed a concentration-dependent elevation in the tracheal contractile response (Figure 7). As illustrated in Figure 7, preincubation for 15 min with mangiferin (0.1–10 μM) dramatically reduced Ca^{2+} -induced tracheal contraction.

Discussion

The current study shows that the xanthone glucoside mangiferin prevents the contraction of guinea pig tracheal rings induced by distinct spasmogens, including carbachol and allergen stimuli. This effect was abrogated by removal of the epithelium and exposure to the NOS inhibitor, L-NAME, or the guanylate cyclase inhibitor, ODQ. Mangiferin up-regulated NOS3 protein levels in the tracheal tissue. It also caused a dose-dependent increase in the intracellular cGMP levels of cultured tracheal rings via a mechanism that was also sensitive to L-NAME and ODQ treatments. These data suggest that mangiferin activates the nitric oxide-cGMP pathway to prevent airway smooth muscle contraction.

A previous study from Alvarez and collaborators [12] showed that asthma patients benefit from oral therapy with Vimang[®], the brand name of an aqueous extract of *M. indica* stem bark that is traditionally used in the Caribbean region to treat respiratory disorders [1,34,35]. Accordingly, there are consistent reports demonstrating the efficacy of Vimang[®] and mangiferin, its prominent active ingredient, in preventing inflammatory changes in murine models of allergy and asthma [21,36]. Interestingly, the *M. indica* extract is also a potent inhibitor of histamine- and acetylcholine-induced rat tracheal contraction in *in vitro* settings [28,29]. Therefore, there is evidence that mangiferin has combined anti-inflammatory and airway-relaxing properties, which greatly increases the likelihood that this compound represents a potential therapeutic agent for the treatment of asthmatic conditions. To the best of our knowledge, this is the first study designed to assess the antispasmodic activity of mangiferin on the airway smooth muscle system and the first to indicate its molecular mechanism of action. Our findings revealed that mangiferin not only reduced the maximal tracheal contraction induced by distinct spasmogenic agents (allergen, histamine, carbachol and 5-HT) but also shifted the spasmogens-induced concentration-response curves to the right, clearly impacting the efficacy and potency of these agents. Moreover, it is clear that the effect of mangiferin on airway smooth muscle contractile responses is not specific for a certain type of receptor.

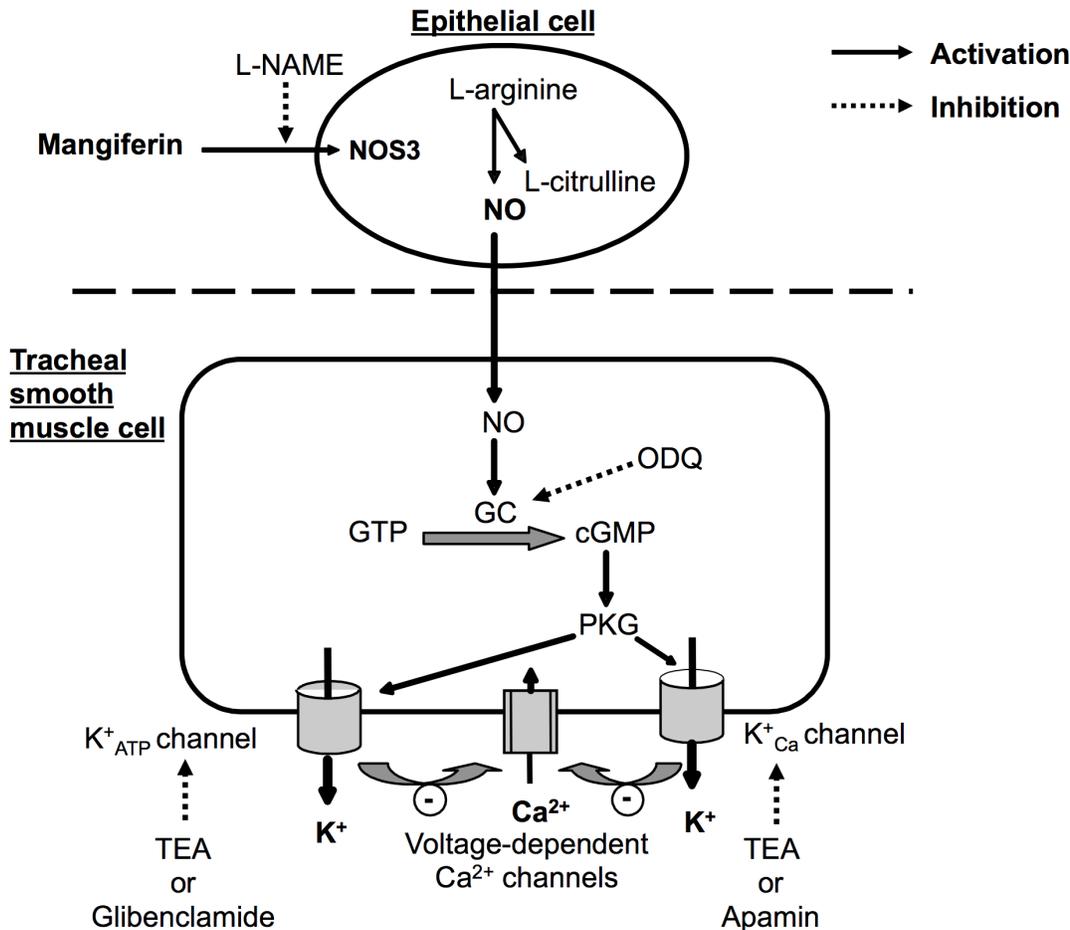


Figure 8. Proposed mechanism of action of mangiferin on guinea pig tracheal epithelium and smooth muscle cells. Mangiferin activates nitric oxide synthase 3 (NOS3) isoform that up-regulates the production of nitric oxide (NO) in the epithelial cell. Nitric oxide activates guanylate cyclase (GC), which increases the level of intracellular cyclic GMP (cGMP). Increased cGMP then activates the protein kinase G (PKG) cascade, enhancing K⁺ efflux and attenuating Ca²⁺ influx-associated smooth muscle cell contractility. GTP (guanosine triphosphate); L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester); ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one); TEA (tetraethylammonium). doi:10.1371/journal.pone.0071759.g008

The observation that tracheal epithelial denudation abrogated the relaxant effect of mangiferin on carbachol pre-contracted or post-contracted segments is of great importance, and it indicates that the integrity of the airway epithelial layer is essential for the antispasmodic activity of mangiferin. Epithelial cells play a paramount role in the modulation of airway tone by working as a physical barrier that protects sensory nerves and smooth muscle cells from inhaled irritants [37]. In addition, the epithelial layer has the ability to release smooth muscle relaxant factors, such as prostaglandin (PG) E₂ and nitric oxide, protecting the airway from excessive bronchoconstriction [37].

Nitric oxide activates guanylate cyclase, which increases the level of intracellular cGMP, relaxing the airway smooth muscle [38]. We preincubated isolated tracheal rings with either L-NAME or ODQ to determine the putative involvement of the nitric oxide-mediated signalling pathway for the inhibitory effect of mangiferin. Our findings revealed that treatment with both these agents prevented the anti-spasmodic activity of mangiferin, whereas the adenylylase inhibitor SQ22536 had no effect. Because PGE₂ increases airway caliber via the activation of adenylylase and subsequent elevation of intracellular cyclic AMP levels (cAMP), our findings indicated that the antispasmodic effect of mangiferin is mediated by cGMP, but not cAMP, ruling out the involvement

of PGE₂ in this effect. We also measured cGMP levels in tracheal tissues exposed to mangiferin to examine whether the relaxant effect of this xanthone correlates with the accumulation of intracellular cGMP. Indeed, mangiferin raised intracellular cGMP levels in a concentration-dependent manner, and this augmentation was completely inhibited by incubation with either L-NAME or ODQ. These results support the interpretation that the relaxant effect of mangiferin is dependent on the activation of the nitric oxide/cGMP signalling pathway in the airway epithelium.

M. indica extract (Vimang), but not mangiferin, has been shown to inhibit vascular smooth muscle contraction triggered by noradrenaline, suggesting that different polyphenols present in the extract might account for the Vimang's vasodepressor effect [39]. However, it is of note that both Vimang and mangiferin share the ability to inhibit interleukin-1 β -induced expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS or NOS2) in vascular smooth muscle cells from WKY rats [39]. Accordingly, mangiferin and *M. indica* extract inhibit NOS2 mRNA expression and nitric oxide production in LPS-activated macrophages [40]. It is well established that despite being continuously expressed, the constitutive forms of NOS (nNOS or NOS1 and eNOS or NOS3) are also sensitive to expressional up regulation, leading to both physiological and pathophysiological consequences [41]. For

instance, aminoguanidine inhibition of NOS2 activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage in rabbits via increase of NOS1 mRNA and protein levels [42]. While exploring the fact that respiratory epithelial cells do express NOS3 [43], we demonstrated in the current study that the treatment with mangiferin effectively increased the protein levels of this constitutive form NOS in cultured epithelium-intact tracheal tissues. These findings add support to the interpretation that mangiferin relaxant properties are closely related with activation of the nitric oxide-formation system.

The relationship between increased tissue levels of cGMP and tracheal smooth muscle relaxation in guinea pigs and other animal species has been reported [44–46]. Most of the nitric oxide- and cGMP-regulated signalling pathways responsible for airway smooth muscle relaxation is mediated by the opening of K^+ channels, including small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ and K^+_{ATP} channels. The activation of K^+ channels causes potassium ion efflux, plasma membrane hyperpolarisation, increased closure of voltage-gated calcium channels and, eventually, a decrease in intracellular calcium levels in smooth muscle cells [32,47]. In the current study, we demonstrated that the anti-spasmodic property of mangiferin is lost in the presence of the non-selective K^+ channel blocker TEA, suggesting the pivotal involvement of K^+ channels in this response. It is also noteworthy that glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker, and apamin, a blocker of small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels, significantly inhibited the anti-contraction effect of mangiferin. We chose these inhibitors because K^+_{ATP} channels and small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels have been strongly implicated in the airway smooth muscle relaxant response. These results suggest that both small conductance K^+_{ca} and K^+_{ATP} channels play a role in the inhibitory effect of mangiferin on tracheal contraction.

There is a significant body of evidence for the existence of voltage-dependent Ca^{2+} channels in airway smooth muscle [48,49]. In the guinea pig airway, tracheal contraction evoked

by KCl is induced by membrane depolarisation and the influx of Ca^{2+} through voltage-dependent Ca^{2+} channels [50]. Mangiferin also inhibited Ca^{2+} -induced contractions in K^+ depolarised preparations of epithelium-intact tracheal rings, suggesting that mangiferin could inhibit Ca^{2+} influx by blocking voltage-dependent Ca^{2+} channels. Taken together, our results indicate that the effect of mangiferin on tracheal tissue is mediated by activation of the nitric oxide cGMP pathway, leading to enhanced K^+ efflux with subsequent attenuation of Ca^{2+} influx-associated contractility in smooth muscle cells (Figure 8).

Conclusion

Our findings emphasise the ability of mangiferin to inhibit smooth muscle spasms caused by immunological (allergen) and non-immunological (histamine, carbachol and 5-HT) stimuli. These effects seem to be strongly associated with increased NOS3 protein levels and nitric oxide production by epithelial cells, up-regulation of intracellular cGMP and the opening of K^+_{ATP} and small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in smooth muscle cells. These changes block voltage-dependent Ca^{2+} channels, resulting in smooth muscle relaxation. Taken together, these findings demonstrate that mangiferin may be beneficial for the treatment of airflow limitation in human lung diseases.

Acknowledgments

We thank Dr. Patricia Jurgilas from the Oswaldo Cruz Foundation for technical assistance with cGMP measurement.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAM PMRS. Performed the experiments: ABV LPC DBRI VFC. Analyzed the data: MAM ABV LPC DBRI VFC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MHdS. Wrote the paper: MAM ABV LPC DBRI.

References

- Vyas A, Syeda K, Ahmad A, Padhye S, Sarkar FH (2012) Perspectives on medicinal properties of mangiferin. *Mini Rev Med Chem* 12: 412–425.
- Viswanadh EK, Rao BN, Rao BS (2010) Antigenotoxic effect of mangiferin and changes in antioxidant enzyme levels of Swiss albino mice treated with cadmium chloride. *Hum Exp Toxicol* 29: 409–418.
- Lee B, Trung Trinh H, Bae EA, Jung K, Kim DH (2009) Mangiferin inhibits passive cutaneous anaphylaxis reaction and pruritus in mice. *Planta Med* 75: 1415–1417.
- Bowen IH, Jackson BP, Motawe HM (1985) An Investigation of the Stem Bark of *Bersama abyssinica*. *Planta Med* 51: 483–487.
- Bock C, Waldmann KH, Ternes W (2008) Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from the gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract. *Nutr Res* 28: 879–891.
- Joubert E, Manley M, Maicu C, de Beer D (2010) Effect of pre-drying treatments and storage on color and phenolic composition of green honeybush (*Cyclopia subternata*) herbal tea. *J Agric Food Chem* 58: 338–344.
- Menkovic N, Savikin-Fodulovic K, Momcilovic I, Grubisic D (2000) Quantitative determination of secoiridoid and gamma-pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured in vitro. *Planta Med* 66: 96–98.
- Ferrari J, Terreaux C, Sahpaz S, Msonthi JD, Wolfender JL, et al. (2000) Benzophenone glycosides from *Gnidia involucreta*. *Phytochemistry* 54: 883–889.
- Li J, Li WZ, Huang W, Cheung AW, Bi CW, et al. (2009) Quality evaluation of *Rhizoma Belamcandae* (*Belamcanda chinensis* (L.) DC.) by using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216: 2071–2078.
- Li Y, Huang TH, Yamahara J (2008) Salacia root, a unique Ayurvedic medicine, meets multiple targets in diabetes and obesity. *Life Sci* 82: 1045–1049.
- Garcia-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, Haegeman G, Berghe WV (2011) Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett* 305: 21–31.
- Alvarez A, Sanchez C, Garcia D, Rodriguez J, Lemus Y, et al. (2009) Treatment of bronchial asthma with an aqueous extract of *Mangifera indica* L. (Vimang): two cases report. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8: 63–66.
- Nunez Selles AJ, Velez Castro HT, Aguero-Aguero J, Gonzalez-Gonzalez J, Nadeo F, et al. (2002) Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem* 50: 762–766.
- van der Merwe JD, Joubert E, Manley M, de Beer D, Malherbe CJ, et al. (2012) Mangiferin glucuronidation: important hepatic modulation of antioxidant activity. *Food Chem Toxicol* 50: 808–815.
- Sato T, Kawamoto A, Tamura A, Tatsumi Y, Fujii T (1992) Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthone). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 40: 721–724.
- Singh AK, Sharma PV, Kumar IV, Kumar SS, Sinha SK (2009) Phytochemical and pharmacological investigations on mangiferin. *Herba Polonica* 55: 126–139.
- De A, Chattopadhyay S (2009) The variation in cytoplasmic distribution of mouse peritoneal macrophage during phagocytosis modulated by mangiferin, an immunomodulator. *Immunobiology* 214: 367–376.
- Makare N, Bodhankar S, Rangari V (2001) Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *J Ethnopharmacol* 78: 133–137.
- Marquez L, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Leza JC (2012) Mangiferin decreases inflammation and oxidative damage in rat brain after stress. *Eur J Nutr* 51: 729–739.
- Wei Z, Yan L, Deng J, Deng J (2011) [Effects of mangiferin on MAPK signaling pathway in chronic inflammation]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 36: 1798–1802.
- Rivera DG, Hernandez I, Merino N, Luque Y, Alvarez A, et al. (2011) *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma. *J Pharm Pharmacol* 63: 1336–1345.
- Hudecova A, Kusznierewicz B, Hasplova K, Huk A, Magdolenova Z, et al. (2012) *Gentiana asclepiadea* exerts antioxidant activity and enhances DNA

- repair of hydrogen peroxide- and silver nanoparticles-induced DNA damage. *Food Chem Toxicol* 50: 3352–3359.
23. Sissing L, Marnewick J, de Kock M, Swanevelder S, Joubert E, et al. (2011) Modulating effects of rooibos and honeybush herbal teas on the development of esophageal papillomas in rats. *Nutr Cancer* 63: 600–610.
 24. Stretton D (1991) Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 18: 675–684.
 25. Brecht DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768–770.
 26. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 84: 731–765.
 27. Katsuki S, Murad F (1977) Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 13: 330–341.
 28. Agbonon A, Eklu-Gadegbeku K, Aklirikou K, Essien K, Akpagana K, et al. (2002) The effect of *Mangifera indica* stem bark and *Pluchea ovalis* roots on tracheal smooth muscle in vitro. *Fitoterapia* 73: 619–622.
 29. Agbonon A, Aklirikou K, Gbeassor M (2005) *Mangifera indica* stem bark effect on the rat trachea contracted by acetylcholine and histamine. *Pharmaceutical Biology* 43: 475–479.
 30. Coelho LP, Serra MF, Pires AL, Cordeiro RS, Rodrigues e Silva PM, et al. (2008) 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 327: 206–214.
 31. Wu BN, Lin RJ, Lo YC, Shen KP, Wang CC, et al. (2004) KMUP-1, a xanthine derivative, induces relaxation of guinea-pig isolated trachea: the role of the epithelium, cyclic nucleotides and K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 142: 1105–1114.
 32. Kume H, Takai A, Tokuno H, Tomita T (1989) Regulation of Ca²⁺-dependent K⁺-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature* 341: 152–154.
 33. da Costa JC, Olsen PC, de Azeredo Siqueira R, de Frias Carvalho V, Serra MF, et al. (2007) JMF2-1, a lidocaine derivative acting on airways spasm and lung allergic inflammation in rats. *J Allergy Clin Immunol* 119: 219–225.
 34. Garrido-Suarez BB, Garrido G, Delgado R, Bosch F, del CRM (2010) A *Mangifera indica* L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin. *Molecules* 15: 9035–9045.
 35. Nunez-Selles AJ, Delgado-Hernandez R, Garrido-Garrido G, Garcia-Rivera D, Guevara-Garcia M, et al. (2007) The paradox of natural products as pharmaceuticals. Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacol Res* 55: 351–358.
 36. Sa-Nunes A, Rogerio AP, Medeiros AI, Fabris VE, Andreu GP, et al. (2006) Modulation of eosinophil generation and migration by *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Int Immunopharmacol* 6: 1515–1523.
 37. Folkerts G, Nijkamp FP (1998) Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol Sci* 19: 334–341.
 38. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109–142.
 39. Beltran AE, Alvarez Y, Xavier FE, Hernanz R, Rodriguez J, et al. (2004) Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *Eur J Pharmacol* 499: 297–305.
 40. Garcia D, Delgado R, Ubeira FM, Leiro J (2002) Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extracts Vimang and mangiferin. *Int Immunopharmacol* 2: 797–806.
 41. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12: 773–790.
 42. Zheng B, Zheng T, Wang L, Chen X, Shi C, et al. (2010) Aminoguanidine inhibition of iNOS activity ameliorates cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rabbits via restoration of dysfunctional endothelial cells. *J Neurol Sci* 295: 97–103.
 43. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, et al. (1994) Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* 94: 2231–2236.
 44. Suzuki K, Takagi K, Satake T, Sugiyama S, Ozawa T (1986) The relationship between tissue levels of cyclic GMP and tracheal smooth muscle relaxation in the guinea-pig. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 13: 39–46.
 45. Felbel J, Trockur B, Ecker T, Landgraf W, Hofmann F (1988) Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J Biol Chem* 263: 16764–16771.
 46. McGrogan I, Lu S, Hipworth S, Sormaz L, Eng R, et al. (1995) Mechanisms of cyclic nucleotide-induced relaxation in canine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 268: L407–413.
 47. Abderrahmane A, Salvail D, Dumoulin M, Garon J, Cadioux A, et al. (1998) Direct activation of K(Ca) channel in airway smooth muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism? *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 485–497.
 48. Marthan R, Martin C, Amedee T, Mironneau J (1989) Calcium channel currents in isolated smooth muscle cells from human bronchus. *J Appl Physiol* 66: 1706–1714.
 49. Hisada T, Kurachi Y, Sugimoto T (1990) Properties of membrane currents in isolated smooth muscle cells from guinea-pig trachea. *Pflugers Arch* 416: 151–161.
 50. Knox AJ, Tattersfield AE (1995) Airway smooth muscle relaxation. *Thorax* 50: 894–901.