



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba- FOA/UNESP

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

LETÍCIA VILMA DOS SANTOS VIEIRA

**HISTAMINA INDUZ INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E
PRODUÇÃO DE MUCO EM PULMÃO DE CAMUNDONGOS**

ARAÇATUBA

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba- FOA/UNESP

Departamento de Ciências Básicas

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

LETÍCIA VILMA DOS SANTOS VIEIRA

HISTAMINA INDUZ INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS E PRODUÇÃO DE MUCO EM PULMÃO DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos Requisitos para a obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”

Orientadora: Profa. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira

ARAÇATUBA

2017

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V658h Vieira, Leticia Vilma dos Santos.
Histamina induz inflamação das vias aéreas e produção de muco em pulmão de camundongos / Leticia Vilma dos Santos Vieira. - Araçatuba, 2017
104 f. : il.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Histamina 2. Inflamação 3. Mucinas 4. Colágeno
5. Quimiocina CCL3 6. Remodelação das vias aéreas I. T.

CDD 612

LETÍCIA VILMA DOS SANTOS VIEIRA

Nascimento: 27 de dezembro de 1989

Localidade: Valparaíso-SP

Filiação: Maria Cristina dos Santos e Edgard Vieira

2007–2010: Graduação em Farmácia-Bioquímica pela
Universidade Paulista – UNIP, Araçatuba-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, berço do meu destino, com todo o meu amor, honra e gratidão.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo incessante, entendimento e fortalecimento da minha fé diante das adversidades.

À Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira, pela orientação e oportunidade de crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, e toda equipe do Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação Experimental (ICB/USP), pela sublime paciência e disponibilidade nos ensinamentos de técnicas utilizadas neste projeto.

Ao Prof. Dr. Wagner André Pedro (FMVA/UNESP) pelo apoio, amizade e por ser um templo aberto de sabedoria, bondade e humanitarismo.

Às professoras Suely Bonfim e Valéria Marçal Felix de Lima pela contribuição científica com o presente trabalho, através do Exame Geral de Qualificação.

Aos amigos de laboratório Ayná, Carluci, Dayane, Kellen, Maria Carolina, Mariana e Victor, toda a minha gratidão pela disponibilidade, dedicação e apoio. Espero que possamos extrapolar os limites do tempo, e assim compartilhar de outros momentos e emoções até quando e onde Deus permitir. Vocês são especiais, e dignos de um caminho brilhante e próspero.

Aos amigos Jéssica, Murilo e Simone, do Departamento de Ciências Básicas (FOA/UNESP), pela amizade, companheirismo, incentivo e sobretudo pelo convívio empolgante.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP) e a todos os seus funcionários por todo auxílio, suporte e cordialidade.

A CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro, o qual foi imprescindível para a realização deste trabalho.

“A melhor religião do mundo é o amor; a melhor filosofia, a caridade e a melhor ciência é o discernimento”

João N. Maia/Miramez

VIEIRA, L. V. S. Histamina induz inflamação das vias aéreas e produção de muco em pulmão de camundongos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista- UNESP. Araçatuba, 2017.

RESUMO

Na inflamação alérgica, a histamina desencadeia papel crucial na indução de sintomas, tais como vasodilatação, broncoconstrição e produção de muco. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da histamina na inflamação e no remodelamento das vias aéreas, avaliando para tanto a produção de muco e colágeno em modelo murino de inflamação pulmonar. Camundongos Balb/c machos de 20-25g foram estimulados, por via intratraqueal, com histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μ M) e avaliados após 6, 24 e 48 horas. A partir dos dados resultantes do ensaio dose-resposta, foi realizado tratamento farmacológico, onde animais foram separados em 5 grupos (6 camundongos por grupo): Grupo 1 (PBS), controle não estimulado; Grupo 2 (Histamina), controle estimulado; Grupo 3 (Histamina + Loratadina); Grupo 4 (Histamina + Dexametasona) e Grupo 5 (Histamina + Dexametasona e Loratadina). Analisamos a migração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) e no tecido pulmonar. As alterações estruturais no tecido pulmonar e na traqueia foram avaliadas por análise histopatológica, bem como a produção de muco e deposição de colágeno usando *Alcian blue/Periodic Acid Schiff* e Tricômio de Masson, respectivamente. O sobrenadante do LBA e o tecido pulmonar foram coletados para quantificar os níveis SCF e CCL3 por ELISA de captura. A expressão gênica de *Muc5ac*, *Gob-5*, *Col1a2* e receptores de histamina foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Nossos resultados demonstram que a histamina induz inflamação das vias aéreas, com presença de infiltrado leucocitário no LBA e no tecido pulmonar. Além disso, os animais estimulados com histamina demonstraram aumento significativo na expressão gênica de *Muc5ac*, *Gob-5* e *Col1a2* no tecido pulmonar, produção SCF e CCL3 no LBA e pulmão, bem como apresentaram alterações estruturais na traqueia e no tecido pulmonar, tais como infiltrado leucocitário, presença de células caliciformes, produção de muco e depósito de colágeno. O pré-tratamento com dexametasona (DEX) inibiu a migração

leucocitária no LBA e tecido pulmonar, e também diminuiu a expressão gênica de *Muc5ac* no tecido pulmonar, diminuiu a produção de SCF e CCL3 no LBA e pulmão, bem como reduziu a produção de muco e a deposição de colágeno no pulmão. Já o pré-tratamento com loratadina (LOR), bloqueador de H₁, inibiu parcialmente a migração celular no LBA, mas não no tecido pulmonar, enquanto que a associação farmacológica entre DEX e LOR diminuiu significativamente a migração leucocitária tanto no LBA como no tecido pulmonar. Com base nos dados acima, sugere-se que a histamina induz inflamação das vias aéreas, promovendo a migração de leucócitos possivelmente através da produção de SCF e CCL3, bem como provoca alterações estruturais na traqueia e no tecido pulmonar, tais como produção de muco, deposição de colágeno, e esses efeitos tem a participação dos receptores H₁ e H₄.

Palavras- chave: histamina, inflamação pulmonar, células caliciformes, produção de muco, deposição de colágeno, remodelamento das vias aéreas, SCF, CCL3

VIEIRA, L. V. S. Histamine induces airway inflammation and mucus production in lung tissue of mice. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista- UNESP. Araçatuba. 2017.

ABSTRACT

In allergic inflammation, histamine exerts a crucial role in the induction of symptoms, such as vasodilation, bronchoconstriction and mucus production. The aim of this study was to investigate the effects of histamine in inflammation and airway remodeling, evaluating the mucus production and collagen in a murine model of pulmonary inflammation. Male Balb/c mice of 20-25g were challenged by intratracheal instillation of histamine at different concentrations (10, 50 and 100 μ M) and evaluated after 6, 24 and 48 hours. From the data resulting from the dose-response assay, pharmacological treatment was performed, and animals were separated into 5 groups (6 mice per group): Group 1 (PBS), non-challenged control; Group 2 (Histamine), challenged control; Group 3 (Histamine + Loratadine); Group 4 (Histamine + Dexamethasone) and Group 5 (Histamine + Dexamethasone and Loratadine). We analyzed the recruitment of leukocytes in bronchoalveolar lavage (BAL) and lung tissue. Structural changes in lung tissue and trachea were assessed by histopathological analysis, as well as mucus production and collagen deposition using *Alcian blue/Periodic Acid Schiff* and *Masson's Trichrome*, respectively. BAL supernatant and lung tissue were collected for SCF and CCL3 levels quantification by capture ELISA. The gene expression of *Muc5ac*, *Gob-5*, *Col1a2*, and histamine receptors was evaluated by RT-PCR real time. Our results demonstrated that

histamine induces airway inflammation, with presence of leukocyte infiltrate in BAL and lung tissue. In addition, histamine-challenged animals demonstrated a significant increase in the gene expression of *Muc5ac*, *Gob-5* and *Col1a2* in lung tissue, SCF and CCL3 production in BAL and lung, as well as structural changes in the trachea and lung tissue, such as leukocyte infiltrate, presence of goblet cell, mucus production and collagen deposition around the airways. Dexamethasone pre-treatment (DEX) inhibited leukocyte recruitment in BAL and lung tissue, decreased gene expression of *Muc5ac* in lung tissue, decreases SCF and CCL3 production in BAL and lung, as well as mucus production and collagen deposition in the lung. Already pre-treatment with loratadine (LOR), an H₁ blocker, partially inhibited cell migration in BAL, but not in lung tissue, whereas the pharmacological association between DEX and LOR significantly reduced leukocyte recruitment in both the BAL and the lung tissue. Putting the above data together, we suggest that histamine induces airway inflammation, promoting the recruitment of leukocytes possibly through the production of SCF and CCL3, as well as causes structural changes in the trachea and lung tissue, such as mucus production, collagen deposition, and these effects might be mediated by H₁ and H₄ receptors.

Keywords: histamine, pulmonary inflammation, goblet cells, mucus production, collagen deposition, airway remodeling, SCF, CCL3

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA = Albumina sérica bovina

CCL3= Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa

cDNA= Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA= Comissão de Ética de Uso de Animais

Col1a2= Colágeno tipo 1a2

CT= Ciclo limiar

DNase= Nuclease que catalisa a degradação do DNA

ELISA= Ensaio de imunoabsorção enzimática

H&E= Hematoxilina & Eosina

HCL= Ácido clorídrico

HDM= House dust mite

IL= interleucina

LBA= Lavado broncoalveolar

nm= Nanômetros

OVA= Ovalbumina

PBS= Tampão fosfato salino

PCR= Reação em cadeia de polimerase

RT= Transcriptase reversa

RNA= Ácido ribonucleico

RNA_m= Ácido ribonucleico mensageiro

SCF= Stem Cells Factor

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

Th1= linfócitos T auxiliar do tipo 1

Th2= linfócitos T auxiliar do tipo 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Histamina induz migração de leucócitos no LBA de camundongos	51
Figura 2. Histamina provoca alterações no tecido pulmonar de camundongos	53
Figura 3. Histamina induz migração de leucócitos no tecido pulmonar de camundongos	55
Figura 4. Histamina danos severos na traqueia de camundongos	57
Figura 5. Histamina induz produção de SCF e CCL3 no LBA e tecido pulmonar de camundongos	59
Figura 6. Expressão gênica dos receptores de histamina no tecido pulmonar de camundongos	61
Figura 7. Histamina induz produção de muco no tecido pulmonar de camundongos	63
Figura 8. Histamina induz expressão gênica de Gob-5 e Muc5ac no tecido pulmonar de camundongos	65
Figura 9. Histamina induz deposição de colágeno e expressão gênica de Col1a2 no tecido pulmonar de camundongos	67
Figura 10. Efeitos da LOR e/ou DEX na migração de leucócitos no LBA e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina	68
Figura 11. Efeitos da LOR e/ou DEX na traqueia de camundongos estimulados com histamina	71
Figura 12. Efeitos de LOR e/ou DEX nos níveis de SCF e CCL3 no LBA e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina	73
Figura 13. DEX diminui a expressão gênica de H1R e H4R de camundongos estimulados com histamina	74
Figura 14. Efeitos da LOR e/ou DEX na produção de muco em camundongos estimulados por histamina 50µM, nos períodos de 6 e 24 horas	76
Figura 15. Efeitos da LOR e/ou DEX na expressão gênica de Gob-5 e Muc5ac em camundongos estimulados por histamina 50µM, nos períodos de 6 e 24 horas	78
Figura 16. Efeitos da LOR e/ou DEX na deposição de colágeno e expressão gênica Col1a2 no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina 50µM, nos períodos de 6 e 24 horas	80

Figura 17. Diagrama esquemático dos efeitos da histamina em modelo murino de inflamação das vias aéreas 94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivos Gerais	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Animais e aspectos éticos	42
3.2 Instilação Intratraqueal com histamina	42
3.3 Pré-tratamento dos camundongos com Dexamentasona e/ou Loratadina	43
3.4 Avaliação de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA)	43
3.5 Avaliação histopatológica	43
3.5.1 Análise do processo inflamatório no tecido pulmonar	44
3.6 Detecção dos níveis de citocinas e quimiocinas por ELISA	45
3.7 Análise da expressão gênica de <i>Muc5ac</i> , <i>Gob-5</i> , e <i>Col1a2</i> por RT-PCR em tempo real	46
3.7.1 Extração e quantificação do RNA total	46
3.7.2 Transcrição Reversa	47
3.7.3 PCR quantitativo	47
3.8 Identificação da produção de muco e deposição colágeno no tecido pulmonar	49
3.9 Análise estatística de dados	49
4 RESULTADOS	51

4.1 Histamina induz migração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos	51
4.2 Histamina provoca alterações no tecido pulmonar de camundongos	53
4.3 Histamina induz migração de leucócitos no tecido pulmonar de camundongos	55
4.4 Histamina induz danos severos na traqueia de camundongos	57
4.5 Produção de SCF e CCL3 no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina	59
4.6 Expressão gênica dos receptores de histamina no tecido pulmonar de camundongos	61
4.7 Histamina induz expressão gênica de <i>Muc5ac</i> e <i>Gob-5</i> , e produção de muco no tecido pulmonar	63
4.8 Histamina induz expressão gênica de <i>Col1a2</i> e deposição de colágeno no tecido pulmonar	65
4.9 Dexametasona e/ou Loratadina diminui a migração de leucócitos no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina	67
4.10 Dexametasona, isolada ou associada com Loratadina, reduz danos na traqueia de camundongos estimulados com histamina	69
4.11 Dexametasona e/ou Loratadina diminui os níveis de SCF e CCL3 no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina	71
4.12 Dexametasona inibe a expressão gênica de H_1 e H_4	73
4.13 DEX e/ou LOR inibe a expressão gênica de <i>Gob-5</i> , <i>Muc5ac</i> e <i>Col1a2</i> no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina	73
5 DISCUSSÃO	73

6 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas respiratórias, incluindo a asma, têm aumentado significativamente nos últimos anos. De acordo com Organização Mundial de Alergia, 40% da população mundial têm algum tipo de alergia e a estimativa é de que o número de asmáticos no mundo chegue a 400 milhões de pessoas até 2025 (Jensen-Jarolim and Fiocchi 2017). A exposição contínua a diversos alérgenos ambientais (microorganismos, substâncias derivadas de ácaros, pólenes de plantas) e o contato com irritantes (cigarro e poluentes atmosféricos) favorece o desenvolvimento da maioria das doenças respiratórias, entre elas: rinite alérgica e asma. Sendo considerada uma afecção de elevada prevalência e morbidade, a asma é caracterizada por obstrução das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e remodelamento, o qual está associado à redução progressiva da função pulmonar (Vignola, Chanez et al. 1998, Busse and Lemanske 2001).

A fisiopatologia da asma envolve vários mecanismos moleculares e celulares. A resposta inflamatória alérgica se inicia com a interação do alérgeno com algumas células, as quais têm como função apresentá-lo ao sistema imunológico, especificamente aos linfócitos T-helper 2 (Th2) (Lloyd and Hessel 2010). Esses linfócitos, por sua vez, se diferenciam, proliferam e liberam interleucinas (IL), como IL-4, -5, -9 e -13, responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório alérgico (Cookson 1999, Busse and Lemanske 2001). Dentre as citocinas liberadas, a IL-4 possui importante papel no aumento da produção de anticorpos IgE específicos, os quais irão ligar-se aos receptores de alta afinidade (FcεRI) para IgE presentes na membrana celular de mastócitos (Vignola, Chanez et

al. 1998, Busse and Lemanske 2001, Kumar 2001). Após a sensibilização do indivíduo e nova exposição ao alérgeno, ocorre a reação antígeno-anticorpo. Nessa reação, o alérgeno se liga a moléculas de IgEs presentes na superfície dos mastócitos, causando a desgranulação dessas células e a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos, prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, serotonina e histamina (Kitamura, Kanakura et al. 1987). Além disso, após a ativação, os mastócitos sintetizam e secretam citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), SCF, interleucinas (IL)-3, -4, -13, e expressam algumas quimionas como MCP-1, MIP-1 α e -1 β (Galli, Gordon et al. 1991, Abraham and Malaviya 1997, Ajuebor, Das et al. 1999, Wedemeyer, Tsai et al. 2000, Metz and Maurer 2007)

Ainda há muito que compreender sobre os complexos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo inflamatório alérgico. Nesse sentido, vários modelos experimentais de inflamação alérgica têm sido amplamente utilizados na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos, bem como o comportamento dos genes e células no processo inflamatório alérgico. Dentre eles, modelos murinos são amplamente estudados e a proteína ovalbumina (OVA) é o principal alérgeno utilizado para provocar resposta inflamatória alérgica crônica (Kumar, Herbert et al. 2008). Alguns autores criticam o uso de OVA como alérgeno ideal para modelos de inflamação alérgica, devido a tolerância imunológica causada em camundongos durante exposição crônica (Johnson, Wiley et al. 2004). Os modelos agudos com OVA usam adjuvantes, como hidróxido de alumínio, para promover intensa resposta Th2 em murinos, tornando esse protocolo artificial quando comparado aos sintomas das doenças alérgicas em humanos (Brewer, Conacher et al. 1999). Em adição, autores demonstram que o uso de OVA sem adjuvante, em um modelo

agudo, resulta em uma resposta pulmonar eosinofílica idêntica à observada em modelo com adjuvante (Conrad, et al.2009).

Além disso, a análise histológica de modelos agudos demonstram eventos que não são encontrados em modelos murinos de OVA de inflamação aguda, tais como infiltrado inflamatório moderado a intenso, com predomínio de linfócitos e neutrófilos (Hulbert, McLean et al. 1985, Cosio, Majo et al. 2002), bem como alterações persistentes nas estruturas das vias aéreas, as quais caracterizam o remodelamento das vias aéreas (Takayama, et al. 2006; Tang et al., 2006; Rose et al., 2006; Young et al., 2006; Kumar et al., 2002). Esses achados se mostram como motivos relevantes para se discutir e questionar sobre a validade dos protocolos de inflamação alérgica em camundongos, usando OVA. Dessa forma, novos modelos murinos têm sido estudados, e novas alternativas testadas utilizando diferentes alérgenos, como ácaros de poeira doméstica (HDM), fungos (Cicmil 2013, Diaz, Warren et al. 2015), entre outros.

Ao contrário da OVA, a histamina é um mediador inflamatório envolvido na cascata do processo alérgico, bem como desempenha importante papel nas doenças alérgicas, inclusive na fisiopatologia da asma (Gelfand 2002). A literatura demonstra que a histamina pode desencadear efeitos fisiológicos diversos na inflamação alérgica (White 1990, Gelfand 2002, Dunford and Holgate 2010). Em síntese, dada a relevância da histamina na resposta imune e inflamatória, a investigação da participação dessa amina no desenvolvimento de eventos da inflamação pulmonar, sem o uso de adjuvantes, bem como os seus efeitos na produção exacerbada de muco e na deposição de colágeno em camundongos normais, reveste-se de importância.

A histamina pertence à classe das aminas biogênicas, e é sintetizada a partir do aminoácido histidina, sob ação da enzima L-histidina descarboxilase (HDC). Considerada potente mediador inflamatório em inúmeras reações fisiológicas, sua atividade biológica depende da sua interação com quatro subtipos de receptores, acoplados à proteína G (G protein-coupled receptors, GPCRs) (MacGlashan 2003), denominados H₁, H₂, H₃ e H₄ (Jutel, Blaser et al. 2005). As ações provocadas pela histamina, mediadas pelo receptor H₁, estão relacionadas a processos inflamatórios e alérgicos, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco e broncoconstrição (White 1990). Já os receptores H₂, quando ativados, promovem relaxamento da musculatura lisa, e o aumento da resistência das vias aéreas inferiores (Knight, Stewart et al. 1992, Tamaoki, Nakata et al. 1997). Em contraste, os receptores H₃, expressam-se em neurônios histaminérgicos, eosinófilos, dendrócitos, monócitos, apresentam baixa expressão nos tecidos periféricos, e podem ocasionar a inibição da síntese e liberação de histamina (Lamblin, Gosset et al. 1998). Os receptores H₄ foram recentemente identificados, e há evidências de que estejam envolvidos na inflamação alérgica (Ling, Ngo et al. 2004, Gutzmer, Diestel et al. 2005, Dunford, O'Donnell et al. 2006), bem como desempenha importante papel imunomodulador. Nesse sentido, autores demonstraram que a ativação de H₄ expresso em células dendríticas modula a resposta Th₂, e conseqüentemente inibe a liberação de citocinas e quimionas importantes para a ativação de células T (Dunford, O'Donnell et al. 2006). Além disso, foi demonstrado que os receptores H₄ também participam de respostas do tipo Th₁, o que induz a quimiotaxia de células inflamatórias, como neutrófilos, células dendríticas e mastócitos (Takeshita et al., 2003; Thurmond et al., 2004; Gutzmer et al., 2005; Bäumer et al., 2008; Huang e Thurmond, 2008). Dessa forma,

investigar a participação dos receptores da histamina nos modelos experimentais de inflamação alérgica é um grande passo para entender como controlar este processo.

Em adição a essas evidências, a literatura demonstra que a produção de quimiocinas na inflamação das vias aéreas está relacionada à gravidade do processo inflamatório alérgico e à resposta reativa das vias aéreas (Teixeira, Wells et al. 1997, Chibana, Ishii et al. 2003, Ono, Nakamura et al. 2003). As quimiocinas controlam o tráfego de células imunes inatas entre a medula óssea, o sangue e os tecidos periféricos durante a inflamação (Palomino and Marti 2015). A interação desses mediadores inflamatórios com receptores específicos acoplados à proteína G, ativa múltiplas vias de sinalização intracelular e promove efeitos biológicos que caracterizam a doença alérgica (Thelen M. et al., 2001, Oliveira SH. et al., 2003). Estudos anteriores demonstram níveis elevados de CCL2, CCL3 e CCL5 nas reações alérgicas (Broxmeyer et al., 1989; Opdenaker et al., 1993), inclusive no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes asmáticos (Alam, York et al. 1996). Além disso, outros autores demonstram a presença de CCL3 em pulmões de pacientes asmáticos (Sabroe, Hartnell et al. 1999) e o envolvimento dessa quimiocina na migração de neutrófilos e eosinófilos para o epitélio das vias aéreas (Hartl, Krauss-Etschmann et al. 2008). Outro mediador inflamatório importante, e muito investigado no processo alérgico, é a citocina *Stem cells factor* (SCF) (Da Silva, Reber et al. 2006). Há relatos demonstrando que SCF induz a quimiotaxia e sobrevivência de mastócitos, bem como a proliferação/diferenciação de mastócitos imaturos (Da Silva, Reber et al. 2006), e é expresso *in vitro* por várias células das vias aéreas, incluindo as células epiteliais brônquicas (Wen LP, 1996), fibroblastos pulmonares (Kassel, Schmidlin et al. 1998), células do musculo liso brônquico

(Kassel, Schmidlin et al. 1999), células endoteliais (Heinrich, Dooley et al. 1993) e mastócitos pulmonares isolados (De Paulis, 1999; Zhang S., 1998). Além de promover quimiotaxia, SCF é capaz de induzir hiperreatividade das vias aéreas, provocando broncoespasmo (Campbell, Hogaboam et al. 1999). No entanto, diante de todas essas evidências, a participação de SCF em modelos de inflamação alérgica induzido diretamente pela histamina, ainda não foi investigada.

No broncoespasmo há uma redução do calibre das vias aéreas, inflamação da mucosa e produção excessiva de muco por glândulas brônquicas, o que obstrui o fluxo de ar. A hipersecreção de muco é uma característica clinicamente marcante da asma (Melton 2002). Entre os vinte genes de mucina já identificados, *mucin 5AC* (*Muc5ac*) é o principal componente do muco em pacientes asmáticos (Ordonez, Khashayar et al. 2001, Fahy and Dickey 2010). Várias citocinas e quimiocinas induzem a expressão de *Muc5ac* em células epiteliais das vias aéreas. Contudo, já foi demonstrado que as citocinas liberadas pelas células Th2 em pacientes asmáticos, tais como IL-4 (Temann, Prasad et al. 1997), IL-9 (Reader, Hyde et al. 2003) e IL-13 (Kondo, Tamaoki et al. 2002) desempenham papel importante na produção de muco. A literatura sugere que a histamina esteja envolvida na produção de muco, porém não há evidências se esse efeito é desencadeado diretamente ou indiretamente (White 1990).

Na asma, o número elevado de células caliciformes são indicadores da produção excessiva de muco (Rogers 2003). Canais de cloreto de cálcio 1 (CLCA1) presentes nas células epiteliais das vias aéreas, tal como o homólogo de camundongo *Gob-5* (ou mCLCA3), desempenham papel regulatório na produção de muco e estão envolvidos na hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes (Nakanishi, Morita et al. 2001). Estudos demonstram que IL-13 contribui na

diferenciação de células caliciformes em modelo *in vivo* e *in vitro* de asma alérgica (Thai, Chen et al. 2005). Autores demonstram que a transcrição e produção de IL-13 são reguladas pela histamina, o que sugere um possível mecanismo para a produção de muco envolvendo essa amina (Elliott, et al., 2011). Outros estudos demonstram que a histamina induz diferenciação de células caliciformes em células NHBE *in vitro* (Nobuaki, et al. 2012), porém não evidências se esse fato também ocorre em modelos alérgicos *in vivo*.

Além da hipersecreção de muco na inflamação alérgica, há outros eventos que agravam o processo alérgico e interferem na arquitetura das vias aéreas, levando à perda parcial e irreversível da função respiratória em alguns casos de rinite alérgica e asma, caracterizando assim o remodelamento das vias aéreas (Kumar 2001, 2006). Dentre as alterações anatomopatológicas, podem ser observadas hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, aumento no número de células caliciformes, aumento das glândulas submucosas, alteração no depósito e degradação dos componentes da matriz extracelular, entre eles fibras colágenas e elásticas, proliferação de fibroblastos, desenvolvimento de miofibroblastos e aumento da vascularidade (Maud et al., 2007; 2006). A literatura aponta que diferentes estímulos, como por exemplo TGF- β , contribui com o espessamento da membrana basal e induz a produção de proteínas por fibroblastos, tais como: fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos e colágenos I e III (Kovacs et al., 1994). A deposição de colágeno é um potente marcador do processo de remodelamento, e há vários estudos demonstrando que a quantidade de colágeno na submucosa é proporcional à gravidade, duração da doença e níveis da função pulmonar (Jeffery, et al.1989; Wilson et al., 1997; Godfrey et al., 1995). Em contrapartida, outros estudos sustentam a hipótese de que o espessamento da

membrana basal, envolvendo o colágeno, não pode ser relacionado com a severidade da doença (Chetta et al. 1997). Diante dessas evidências, a avaliação da deposição de colágeno em modelo de inflamação alérgica aguda é necessária para evidenciarmos o real papel dessa proteína no remodelamento das vias aéreas inferiores e superiores. Sabe-se também que mediadores inflamatórios liberados por mastócitos, tais como cysLTS, serotonina e histamina, podem estar envolvidos no remodelamento das vias aéreas (Nobuaki, et al. 2013). Nesse sentido, é importante avaliar a participação da histamina no remodelamento das vias aéreas, considerando que pouco é abordado se esse evento ocorre de forma direta, concomitantemente ou independentemente da extensão do processo inflamatório. Esta investigação poderá nos trazer novas estratégias terapêuticas afim de diminuir, reverter ou prevenir o processo de remodelamento das vias aéreas.

Para amenizar a progressão do processo inflamatório alérgico, compostos anti-histamínicos ligam-se competitivamente nos receptores de histamina, impedindo assim a ligação dessa amina, e conseqüentemente os seus efeitos patológicos (Harold et al., 2003). Os anti-histamínicos estão entre os fármacos de escolha no tratamento da asma, e causam um deslocamento paralelo na linha concentração/resposta da histamina (Criado, Criado et al. 2010). Há evidências de que os anti-histamínicos H₁ são ineficazes no tratamento da asma, porém isso se reverte quando utilizados em altas doses, ou quando associados com outras drogas (Eiser et al., 1991). Contudo já foi demonstrado que em doses recomendadas para tratar rinite alérgica, os anti-histamínicos de segunda geração como cetirizina, desloratadina e loratadina melhoram os sintomas da asma leve, além de melhorar a função pulmonar de modo significativo (Ekstrom, et al. 1995;

Busse et al., 1996). Diante do exposto, são necessários estudos adicionais sobre os efeitos dos anti-histamínicos H₁ em pacientes com alergia e asma.

Além dos anti-histamínicos, os glicocorticóides são fármacos utilizados para controlar a inflamação das vias aéreas em pacientes asmáticos (Takami, Mizuno et al. 2012). A efetividade dessas drogas no processo inflamatório alérgico se dá por ações anti-inflamatórias, ou seja, age estimulando ou inibindo a transcrição gênica de diversos mediadores inflamatórios responsáveis pelo início e manutenção da resposta inflamatória (Mueller et al., 2013; Negrete-Garcia et al., 2010). Além desse efeito, os glicocorticóides agem diretamente na maioria das células envolvidas na inflamação alérgica, tais como linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos, e células epiteliais das vias aéreas (Goulding et al., 1998; Scheleimer et al., 1993). Outro efeito importante desses fármacos é a supressão da hipersecreção de muco associada com a inflamação das vias aéreas, aliviando assim as manifestações clínicas prejudiciais de um ataque asmático (Kai, Yoshitake et al. 1996, Takami, Mizuno et al. 2012). Há outros relatos demonstrando que a dexametasona inibe a expressão e produção de *MUC2* e *MUC5AC* em células de câncer de pulmão *in vitro* (Kai, Yoshitake et al. 1996). Outras evidências na literatura sugerem que a dexametasona e outros glicocorticoides, como hidrocortisona e prednisona, são capazes de regular a produção de histamina (Hirasawa, et al. 1990), bem como inibir os seus efeitos em estudos *in vitro* com células do músculo liso das vias aéreas (Hard, et al. 1996). Conseqüentemente, avaliar a ação dessas drogas nos processos de inflamação, e também de reparo, são de grande importância, sobretudo em modelos de inflamação alérgica induzido diretamente por histamina.

O conjunto de informações descritas exemplifica a complexidade do processo inflamatório alérgico, e demonstra que estudos existentes atribuem à histamina

ações importantes nesse processo, o que justifica novas descobertas mais detalhadas a esse respeito. Considerando que essa amina é reconhecida como um componente importante das respostas imunes/inflamatórias, e poucos estudos utilizam histamina como indutor de inflamação pulmonar, o objetivo desse estudo é investigar os efeitos da histamina na inflamação das vias aéreas, bem como a sua relação com a produção de muco e deposição de colágeno em camundongos normais. Assim, esses esclarecimentos podem contribuir com novos alvos terapêuticos e preventivos que modulem essa resposta inflamatória, envolvendo a histamina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da histamina sobre a inflamação das vias aéreas, produção de muco e deposição de colágeno em camundongos normais.

2.2. Objetivos Específicos

Para alcançarmos os objetivos propostos, avaliamos:

- a) Migração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) e no tecido pulmonar;
- b) Alterações estruturais no tecido pulmonar e na traqueia, após a instilação intratraqueal de histamina, por coloração de H&E;
- c) A produção da citocina SCF e da quimiocina CCL3 no lavado broncoalveolar (LBA) e tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina, por meio do ensaio imuno-enzimático (ELISA);
- d) A expressão gênica de receptores de histamina H_1 , H_2 , H_3 e H_4 no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina por meio de RT-PCR em tempo real;
- e) Produção de muco e deposição de colágeno no tecido pulmonar, por coloração Alcian blue/Periodic Acid Schiff e Tricômio de Masson, respectivamente;

- f) A expressão gênica de *Muc5ac*, *Gob-5* e *Col1a2* no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina por meio de RT-PCR em tempo real;
- g) O efeito da dexametasona e/ou loratadina sobre a migração leucocitária e produção de SCF e CCL3 no lavado broncoalveolar (LBA) e tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina;
- h) O efeito da dexametasona e/ou loratadina sobre a expressão gênica dos receptores de histamina H_1 e H_4 , *Muc5ac*, *Gob-5* e *Col1a2* no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina, através de RT-PCR em tempo real;
- i) O efeito da dexametasona e/ou loratadina sobre a produção de muco e deposição de colágeno em camundongos estimulados por histamina, por coloração de Alcian Blue/Periodic Acid Schiff e Tricômio de Masson;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e aspectos éticos

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 132 camundongos Balb/c machos (20-25g) provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/Unesp. Até a realização dos experimentos, os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura em torno de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade $55\% \pm 3\%$, com sistema de exaustão e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, e consumo de ração e água *ad libitum*. No ensaio dose-resposta, os camundongos foram igualmente distribuídos em dois grupos experimentais (n=6), sendo eles: controle e histamina (H) em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM), e avaliados em diferentes períodos (6, 24 e 48 horas). Após a análise dos dados do ensaio dose-resposta, os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=6), sendo eles: controle, histamina (H), histamina + loratadina (LOR), histamina + dexametasona (DEX) e histamina + dexametasona e loratadina (DEX+LOR). Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia- UNESP, Araçatuba-SP, Brasil, processo nº 00564/2016.

3.2 Instilação intratraqueal com histamina

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (50 mg/kg- Cetamin, Syntec, Hortolândia, SP, Brasil) com cloridrato de xilazina (2% - Calmiun, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil). As traqueias dos animais foram expostas cirurgicamente, e agulhas ultra-fine estéril (0,25 x 6mm; Becton, Dickinson and Company, New Jersey, Franklin Lakes) foram

utilizadas para instilar 50 μ L de solução de histamina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USAN) nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M, por via intratraqueal. Os animais foram avaliados 6, 24 e 48 horas após a instilação intratraqueal de histamina. Os animais do grupo controle receberam somente 50 μ L de PBS estéril, também por via intratraqueal. Após os períodos mencionados, os animais foram eutanasiados por overdose de cloridrato de quetamina (100 mg/kg) com xilazina (10 mg/kg), e então foram coletados o lavado broncoalveolar (LBA), pulmões e traqueia para posteriores análises.

3.3 Pré-tratamento dos camundongos com Dexametasona e/ou Loratadina

Os camundongos foram pré-tratados com dexametasona 10 μ M (5mg/kg, i.p., Sigma- Aldrich) e/ou loratadina 10 μ M (5mg/kg, i.p., Sigma- Aldrich) 1 hora antes do estímulo (histamina). Ambas as drogas foram aplicadas por via intraperitoneal, num volume de 50 μ L. Após o período estipulado, foi coletado o lavado broncoalveolar (LBA), os pulmões e traqueia a fim de avaliar a resposta inflamatória. Parte do pulmão retirado (lobo direito superior), após o estímulo, foi coletado em 1mL de Trizol® para detectar a expressão gênica de *Muc5ac*, *Gob-5*, *Col1a2* e *receptores de histamina* por RT-PCR em tempo real. As demais partes do pulmão foram coletadas para verificação da integridade epitelial pulmonar (lobo esquerdo) e produção de mediadores inflamatórios (lobo direito médio) por meio de análise histológica e ELISA, respectivamente.

3.4 Avaliação de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA)

Para avaliar a resposta inflamatória, foi coletado o lavado broncoalveolar (LBA) por meio da infusão de 0,8 mL de PBS (tampão fosfato salina) por 2 vezes consecutivas (volume total 1,6mL) na cânula traqueal, com o uso de uma seringa

descartável estéril (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, Franklin Lakes). O volume recuperado via cânula traqueal foi centrifugado a 1200 rpm, 5 min., 4°C. O sobrenadante, após a centrifugação, foi armazenado a -80°C para análises posteriores de citocinas e quimiocinas, enquanto que o sedimento celular foi ressuspenso em 200 µL de PBS/ 1% BSA. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o auxílio de um hemocítmetro de Neubauer no aumento de 400x. Para a contagem diferencial de células, 200 µL do LBA foram citocentrifugados a 800 rpm por 5 minutos (Cytospin, Cheshire, UK). Para o preparo dessas lâminas foi utilizada a técnica de Diff-Quick (Kokusai Shinyaku Co., Kobe, Japão). A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de pelo menos 100 leucócitos/lâmina, e a diferenciação seguiu os critérios morfológicos padrão.

3.5 Avaliação histopatológica

O pulmão esquerdo e a traqueia foram fixados em formaldeído tamponado 4% por 24 horas. Após esse período, os tecidos foram processados em soluções seriadas de álcool e xilol para desidratação, e em sequência incluídos em parafina. Para a confecção das lâminas, cortes seriados de 5 µm de espessura foram coletados. As análises histológicas foram feitas para identificar alterações estruturais no pulmão e traqueia por meio de coloração de hematoxilina e eosina (H&E).

3.5.1 Análise do processo inflamatório no tecido pulmonar

O infiltrado inflamatório no tecido pulmonar foi analisado nas lâminas coradas com H&E por microscopia de luz (Olympus, CX31, Shinjuku, Tóquio, Japão). Foi realizada a técnica de contagem de pontos e retas (Weibel 1963) para a quantificação das células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) nas

vias aéreas. Para todas as análises foram avaliados 10 campos de 4 vias aéreas randomicamente selecionadas utilizando um aumento de 400X.

3.6 Detecção dos níveis de citocinas e quimiocinas por ELISA

Os níveis de SCF e CCL3 foram quantificados no lavado broncoalveolar (LBA) e tecido pulmonar, por ensaio imuno-enzimático (ELISA). O tecido pulmonar foi homogeneizado em tampão com inibidores de proteases, com o uso de triturador-homogeneizador elétrico (Labtech Eldorado, Selangor, Malaysia). Após a homogeneização, as amostras foram submetidas a banho de gelo por 1 hora, sendo a cada 15 minutos vortexadas, e por fim centrifugadas a 10.000g por 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -80°C até o momento das análises. Durante o ensaio, placas de 96 poços (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 50 µL/poço dos anticorpos primários anti-SCF e anti-CCL3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluídos 1:250 em tampão fosfato salina 1x (PBS 1x), pH 7,4 e incubadas por 17 horas a 4°C. Depois, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem (PBS 1x mais Tween 20 0,1%) para remoção do excesso de anticorpo, e bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente (TA) com 100 µL PBS 1x mais albumina sérica bovina (BSA) 1% (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após 1 hora, as placas foram lavadas novamente. Um volume de 50 µL de amostra do LBA ou do sobrenadante do tecido pulmonar foi adicionado à placa. As respectivas curvas-padrão foram feitas utilizando as citocinas recombinantes purificadas SCF e CCL3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluídas na base 2, em tampão PBS 1x mais albumina sérica bovina (BSA) 1%. As placas foram incubadas por 3 horas em TA, e posteriormente foram novamente lavadas. Um volume de 50 µL da mistura de anticorpos biotinizados anti-SCF ou anti-CCL3 (R&D Systems, Minneapolis, MN,

USA), diluídos 1:250, foi incubado por 1 hora em TA. Em seguida, as placas foram lavadas, e foi adicionado estreptoavidina conjugada com peroxidase (1:2000) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) por 30 minutos em TA. Decorrido o tempo mencionado, após a lavagem da placa, foi adicionado 50 µL de solução de substrato cromogênico 3,3',5'-tetrametilbenzidina TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos á TA. A reação então foi parada com 100 µL de solução de ácido sulfúrico 1M (Gomes, Filho et al. 2008).

A quantificação da cor produzida nas reações foi feita por espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), em comprimento de onda de 450 nm. A concentração de SCF e CCL3 foi calculada em pg/mL por comparação com os resultados da curva padrão.

3.7 Análise da expressão gênica de *Gob-5*, *Muc5ac*, *Col1a2* e receptores de histamina por RT- PCR em tempo real

3.7.1 Extração e quantificação do RNA total

A extração do RNA total foi realizada por meio da adição do reagente Trizol (Life Technologies- Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) no tecido pulmonar (lobo direito inferior), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para tanto, o tecido pulmonar foi homogeneizado em 1mL de Trizol, com o uso de triturador-homogeneizador elétrico (Labtech Eldorado, Selangor, Malaysia). Posteriormente, foram adicionados 200 µL clorofórmio (Merck, Milipore- Darmstadt, HE, Alemanha), e em seguida, os tubos foram vigorosamente agitados e mantidos em repouso á TA por 3 minutos. Na etapa seguinte, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 13000 g, por 15 minutos, e a fase aquosa superior a cada tubo foi retirada e acondicionada em tubos novos. Para precipitação do RNA foram adicionados 1mL de álcool

isopropílico (Merck, Milipore – Darmstadt, HE, Alemanha) para cada 1mL de fase aquosa coletada. Então, as amostras foram estocadas a -20°C overnight.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 4°C, 13000 g, por 15 minutos, para obtenção dos precipitados. Posteriormente, estes precipitados foram lavados com etanol (Merck, Milipore – Darmstadt, HE, Alemanha) a 75% e novamente centrifugados a 4°C, 10000 g, por 10 minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado e os precipitados formados foram dissolvidos em 15 µL de água tratada com dietilprocarbonato (DEPC) (Applied Biosystems- Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e estocados em freezer a -80°C. Para quantificação do RNA total, alíquota de 2 µL de cada amostra de RNA obtido foi diluída em 98 µL de água destilada ultra pura – livre de DNase/RNase. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Mac 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), considerando as leituras nos comprimentos de onda de 280 e 260 nm.

3.7.2 Transcrição reversa

Com o propósito de eliminar possíveis contaminações por DNA genômico, o RNA total das amostras foi tratado com DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, com a utilização de Kit High Capacity (Applied Biosystems, Life Technologies – Carlsbad, CA, USA), ambos os kits, foram feitos de acordo com instruções do fabricante.

3.7.3 PCR quantitativo

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio das reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman (Applied Biosystems, Life Technologies- Carlsbad, CA, USA), em um aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies

– Carlsbad, CA, USA). Para esta reação foram utilizadas sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM disponibilizadas pela mesma empresa. São elas *Muc5ac* (Mm01276718_m1), *Gob-5* (Mm01320697_m1), *Col1a2* (Mm00483888_m1), *Hrh1* (Mm00434002_s1), *Hrh2* (Mm00434009_s1), *Hrh3* (Mm00446706_m1) e *Hrh4* (Mm00467634_m1). Paralelamente, também foi realizada a amplificação do gene constitutivo com sonda inventoriada disponibilizada pela mesma empresa: β -actina (*Actb* –Mm00607939) fluoróforo VIC.

Para obtenção da melhor eficiência da reação, foram utilizadas diluições seriadas de um pool de amostras de cDNA (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 e 1:64), utilizando as concentrações dos reagentes para o sistema Taqman determinadas previamente.

Para realização do ensaio adicionou-se a microplacas alíquotas de 2 μ L do cDNA na melhor diluição encontrada no teste descrito acima, reagentes Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies – Carlsbad, CA, USA), mais as sondas, tudo como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 μ L. Esta reação de amplificação compreende em 2 minutos á 50°C; 10 minutos á 95°C; e 40 ciclos de 15 segundos á 95°C, e 1 minuto á 60°C, conforme recomendado pelo fabricante. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. Para cada tratamento, foi detectado o valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar) tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do CT do gene alvo é subtraído do valor do CT do normalizador e resulta no

valor de ΔCT ; o valor de ΔCT do gene alvo é, então, subtraído do valor do ΔCT do calibrador (controle não tratado), e é encontrado o valor de ΔCT . Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak and Schmittgen 2001). Uma amostra negativa (Aguado, Garcia-Madrona et al.) foi submetida à reação com cada par das sequências das sondas inventoriadas utilizadas.

3.8 Produção de muco e deposição de colágeno nos cortes histológicos de tecido pulmonar

A produção de muco e a deposição de colágeno foram identificadas nos cortes histológicos de tecido pulmonar dos camundongos, por coloração Alcian Blue/Periodic Acid Schiff (Sigma- Aldrich) e kit para Tricrômio de Masson (Esay Path, São Paulo, SP, Brasil), respectivamente. Tanto o muco como o colágeno são representados por coloração azul nos cortes histológicos. Os procedimentos experimentais foram executados como recomendado pelo fabricante.

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas em aumento de 400x por câmera digital (Leica, DFC 450, Wetzlar, HE, Alemanha), acoplada em um microscópio de luz (Leica, DM4000 B LED, Wetzlar, HE, Alemanha).

3.9 Análise estatística dos dados

Os resultados foram apresentados por média \pm erro padrão da média (EPM), submetidos a teste estatístico Two-way ANOVA seguido por pós-teste Bonferroni. Foram considerados valores estaticamente significantes de $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 6 (Graph Software, La Jolla, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Histamina induz migração de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos

Camundongos estimulados com histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM), por via intratraqueal, apresentaram migração de leucócitos em todos os períodos avaliados (6, 24 e 48 horas) quando comparados com os grupos controle (Figura 1). Dentre os períodos analisados, evidenciamos que houve migração de diferentes tipos de células, tais como: neutrófilos, mononucleares e eosinófilos. Quanto á migração de neutrófilos, identificamos que o pico dessas células ocorreu nos períodos de 6 e 24 horas, nas concentrações 50 e 100 μM , enquanto que em 48 horas foi evidente somente na concentração de 100 μM (Figura 1A). Já a migração de células mononucleares no LBA, foi observada no período de 6 horas, nas concentrações de 50 e 100 μM , enquanto que em 24 e 48 horas o pico foi na concentração de 100 μM (Figura 1B). Por outro lado, a migração de eosinófilos foi demonstrada apenas em 48 horas, na concentração de 100 μM (Figura 1C).

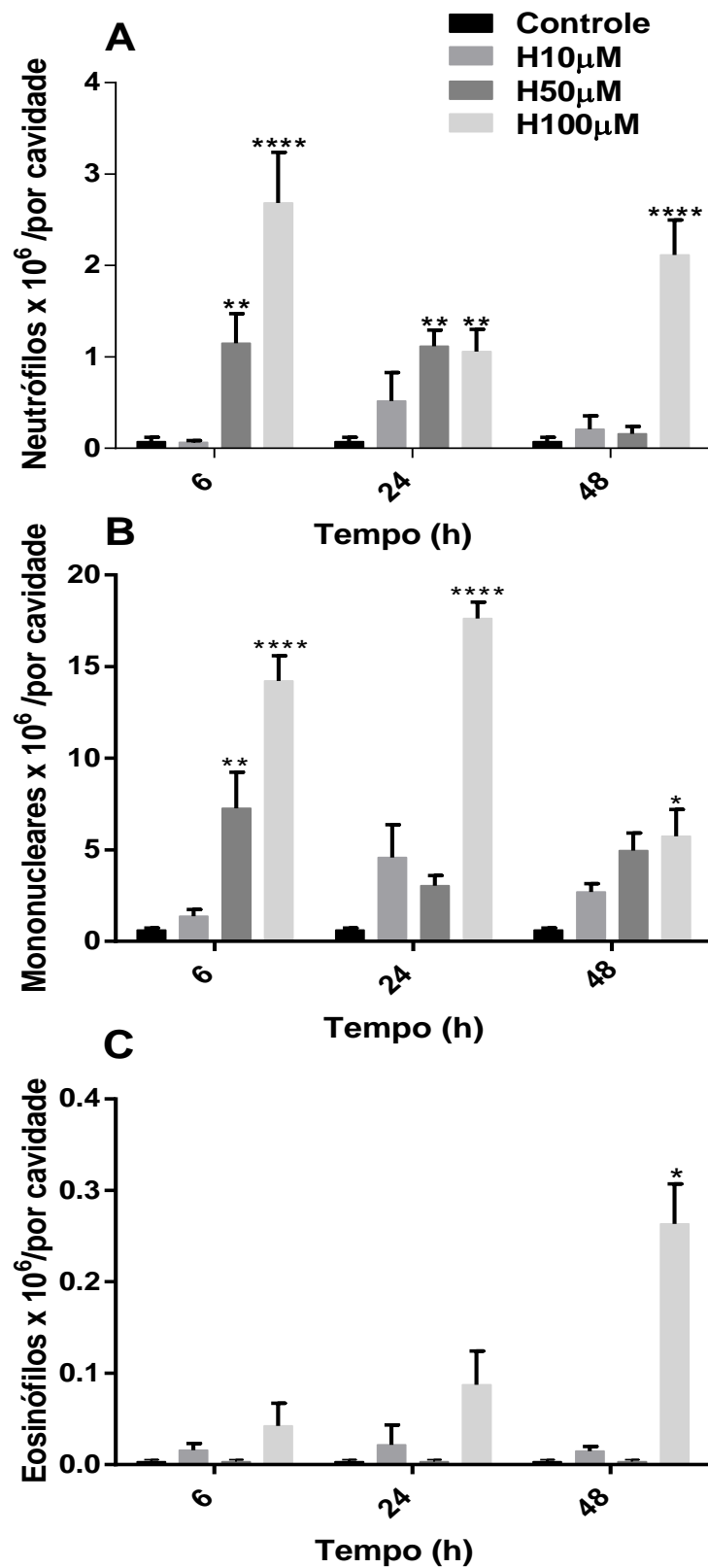


Figura 1. Histamina induz migração de leucócitos no LBA de camundongos. Migração de Neutrófilos (A), Mononucleares (B) e Eosinófilos (C). Avaliada por citocentrifugação e contagem diferencial de células. Dados expressos como Média ± EPM de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento. Valores significativos estão representados por: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 comparados com o grupo controle, no respectivo período.

4.2 Histamina provoca alterações estruturais no tecido pulmonar de camundongos

Os camundongos estimulados com histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM) demonstraram alterações estruturais no tecido pulmonar em todos os períodos analisados (6, 24 e 48 horas) quando comparados com os grupos controle (Figura 2). Nos cortes histológicos do tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina, observamos infiltrado de células inflamatórias nas áreas peribronquial e perivascular, edema e presença de células caliciformes nas vias aéreas (Figuras 2D-L). Evidenciamos que após o estímulo com histamina na concentração de 50 μM , em todos os períodos avaliados, houve presença de infiltrado inflamatório peribroncovascular com maior influxo de neutrófilos, presença de células caliciformes e redução da densidade do parênquima pulmonar, o que afeta a superfície de trocas gasosas exacerbando a resposta inflamatória pulmonar.

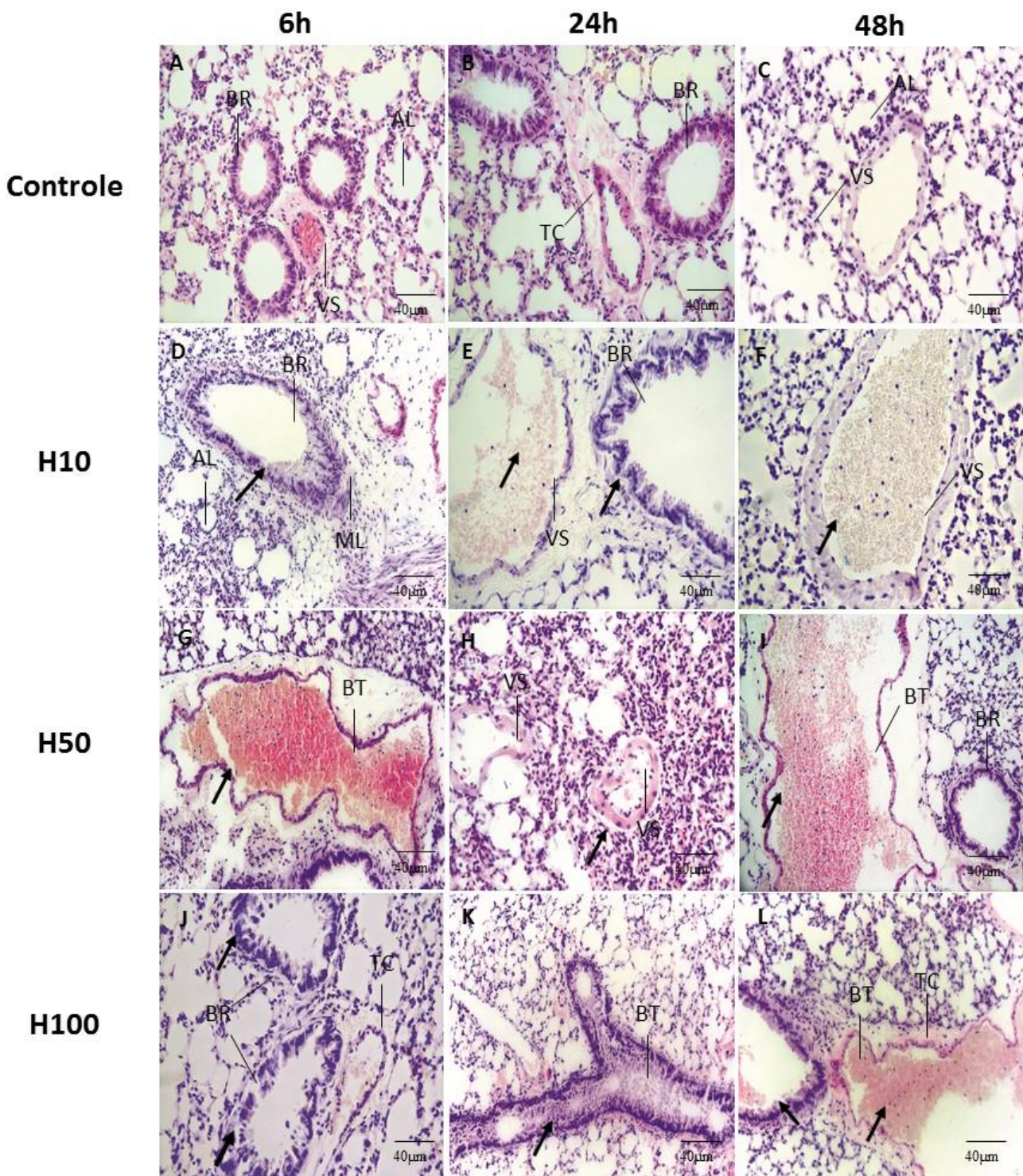


Figura 2. Histamina provoca alterações no tecido pulmonar de camundongos. Lâminas de microscopia coradas com H&E e fotografadas com ampliação de 400x dos grupos controle e histamina (10, 50 e 100 μ M) no período de 6 horas (A, D, G, e J), 24 horas (B, E, H, e K) e 48 horas (C, F, I, e L). As setas indicam a presença de infiltrado celular, células caliciformes e edema nos grupos estimulados com histamina. AL=Alvéolos, BR=Brônquio, BT= Brônquio terminal, TC= Tecido conjuntivo, VS=Vasos sanguíneos.

4.3 Histamina induz migração de leucócitos no tecido pulmonar de camundongos

Os camundongos estimulados com histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM) demonstraram migração de leucócitos no tecido pulmonar em todos os períodos analisados (6, 24 e 48 horas) quando comparados com os grupos controle (Figura 3). Observamos infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar no período de 6 horas, em todas as concentrações testadas de histamina, e em 24 horas o pico dessas células foi evidente nas concentrações de 50 e 100 μM (Figura 3A). A maioria dos neutrófilos foram localizados no lúmen ou ao redor do epitélio das vias aéreas. Já a migração de células mononucleares no tecido pulmonar ocorreu em 6 e 48 horas nas concentrações de 10 e 50 μM , enquanto que em 24 horas o pico foi pronunciado nas concentrações de 50 e 100 μM (Figura 3B). Assim como observado no LBA, os camundongos estimulados com histamina demonstraram migração de eosinófilos no tecido pulmonar apenas no período de 48 horas na concentração de 100 μM (Figura 3C).

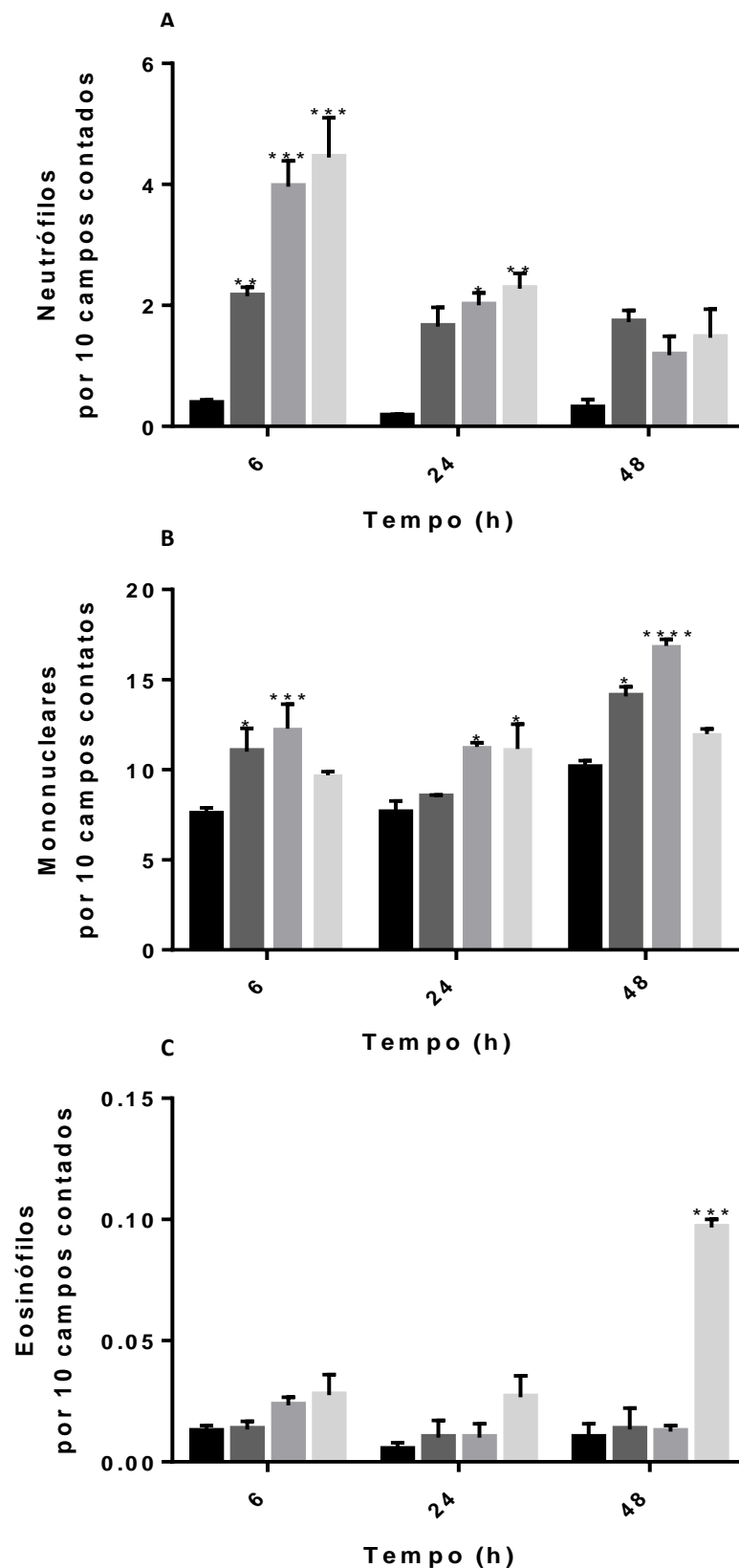


Figura 3. Histamina induz migra33o de leuc33citos no tecido pulmonar de camundongos. Migra33o de Neutr3filos (M), Mononucleares (N) e Eosin3filos (O) no tecido pulmonar, avaliada por contagem diferencial. Dados s33o expressos como M33dia \pm EPM (n=6). Valores significativos est33o representados por: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 comparados com o grupo controle, no respectivo per33odo.

4.4 Histamina induz danos na traqueia de camundongos

Os cortes histológicos das traqueias de camundongos estimulados com histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μM), demonstraram alterações estruturais em todos os períodos analisados (6, 24 e 48 horas) quando comparados com os grupos controle (Figura 4). Os grupos estimulados com histamina apresentaram o tecido epitelial pseudo-estratificado com células caliciformes, enquanto que os animais dos grupos controle demonstraram esse tecido inalterado (Figuras 4A-C). Além disso, os grupos estimulados com histamina nas diferentes concentrações apresentaram obstrução do lúmen traqueal, infiltração de leucócitos, hipertrofia do músculo liso, edema e perda severa da integridade epitelial da traqueia (Figuras 4D-L).

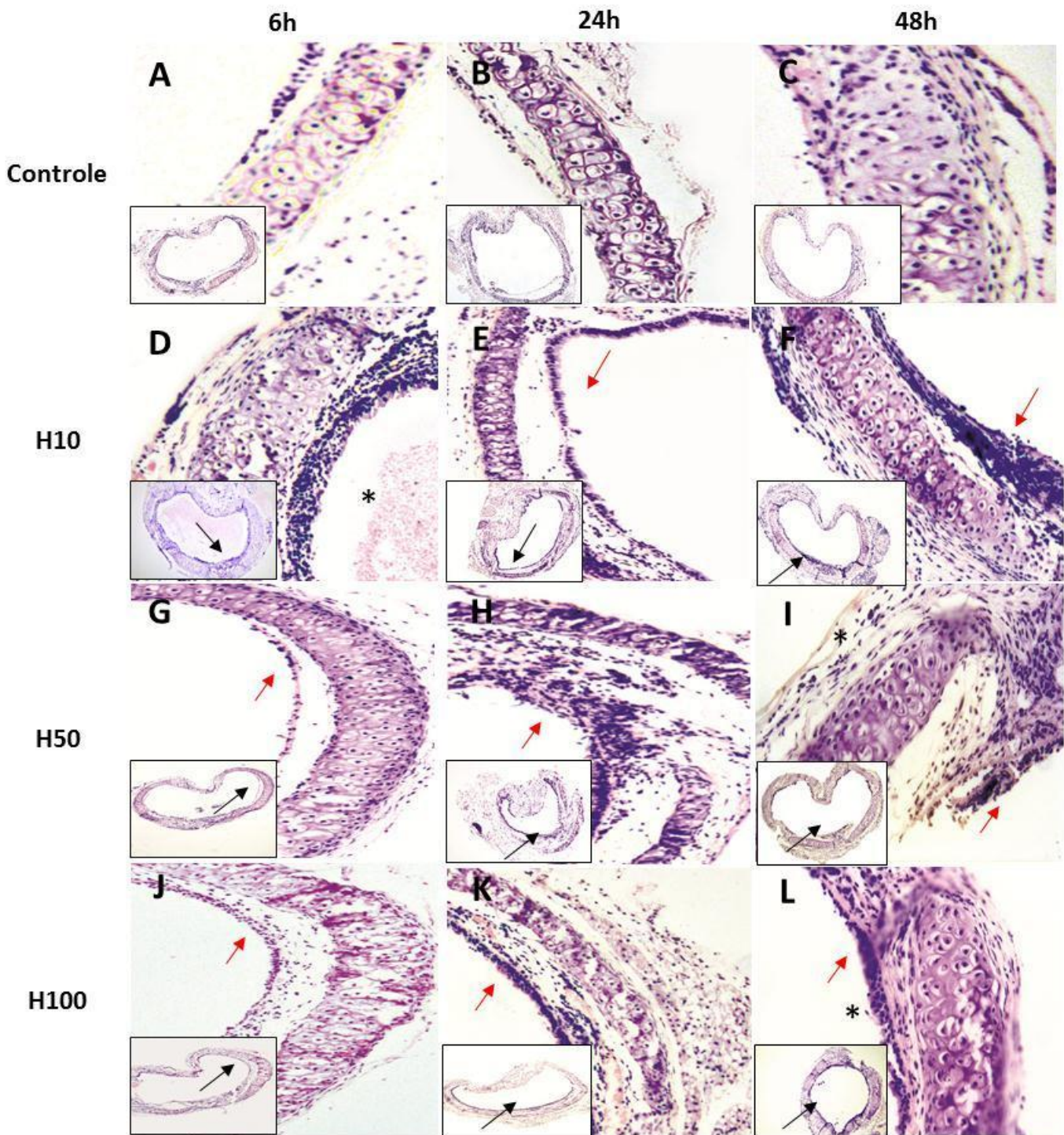


Figura 4. Histamina causa danos severos na traqueia de camundongos. Lâminas de microscopia coradas com H&E e fotografadas com ampliação de 100x e 400x dos grupos controle e histamina (10, 50 e 100 μ M) no período 6 horas (A, D, G, e H), 24 horas (B, E, H, e K), e 48 horas (C, F, I, e L). As setas pretas indicam área danificada, obstrução da luz traqueal e perda severa da integridade epitelial; as vermelhas indicam tecido epitelial de revestimento pseudo-estratificado alterado, presença de células calciformes, e infiltração leucocitária nos grupos desafiados com histamina. Os asteriscos indicam hipertrofia do músculo liso traqueal e edema. CH: Cartilagem Hialina.

4.5 Produção de SCF e CCL3 no LBA e no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina

Para determinar qual mediador inflamatório pode estar envolvido na migração celular leucocitária, avaliamos os níveis de SCF e CCL3 (Figura 5). No LBA, observamos que há aumento nos níveis de SCF em 6 e 24 horas na concentração de 50 μM , enquanto que em 48 horas houve aumento apenas na concentração de 10 μM . Já os níveis de CCL3, no LBA, demonstraram aumento na concentração de 50 e 100 μM , no período de 6 horas e em 24 horas somente na concentração de 50 μM (Figuras 5A e B). Por outro lado, no tecido pulmonar houve aumento dos níveis de SCF no período de 6 horas nas concentrações de 50 μM , e em 24 e 48 horas houve aumento significativo nas concentrações de 10 e 50 μM (Figura 5C). Em relação aos níveis de CCL3 no tecido pulmonar, verificamos que houve aumento somente na concentração de 50 μM , em todos os períodos avaliados (Figura 5D).

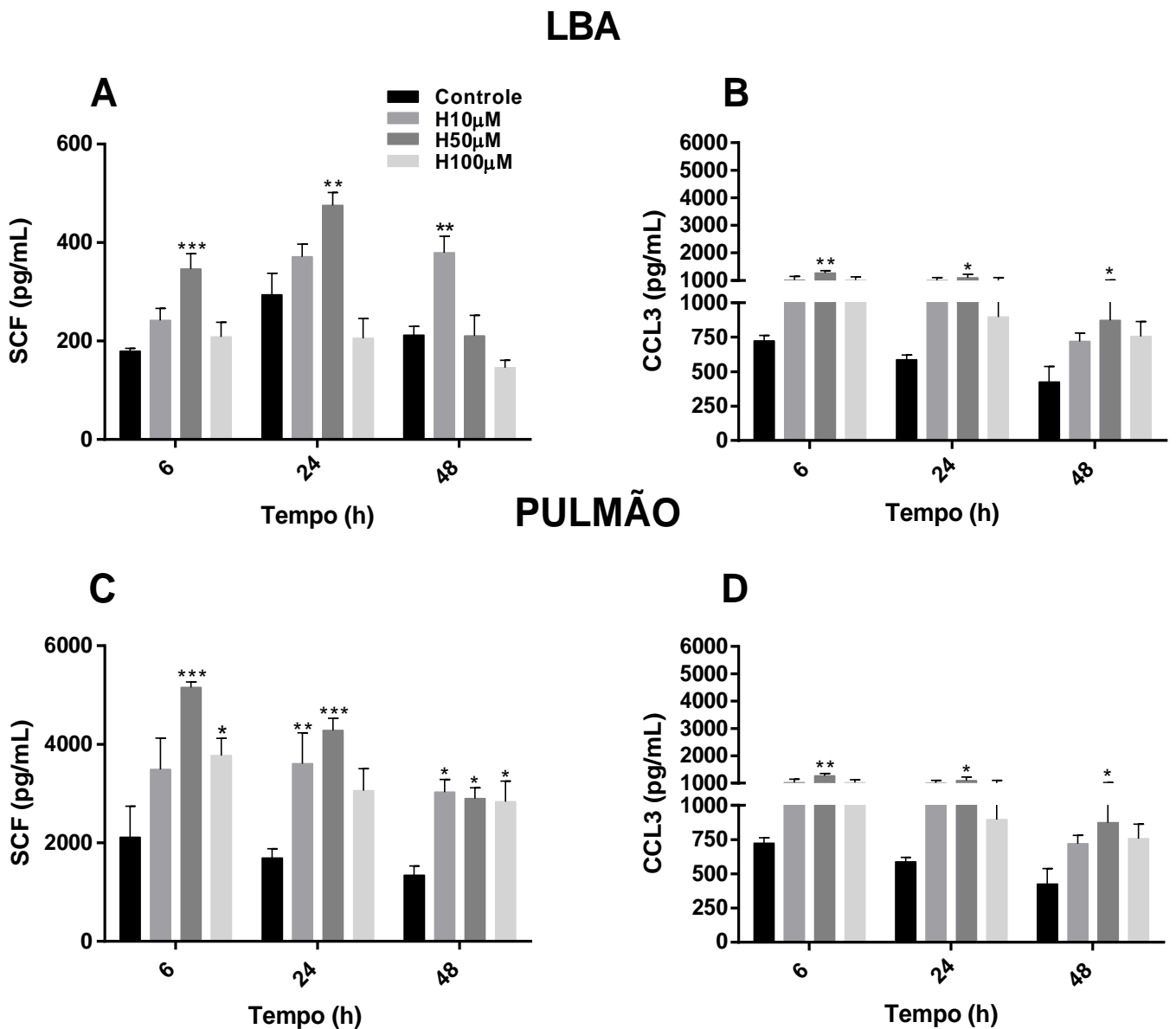


Figura 5. Histamina induz produção de SCF e CCL3 no LBA e tecido pulmonar de camundongos. Níveis de SCF e CCL3 no LBA (A e B) e no tecido pulmonar (C e D) dos grupos controle e histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μ M) e períodos (6, 24 e 48 horas) por ELISA. Dados são expressos como Média \pm EPM (n=6). Valores significativos são representados por: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001, quando comparados com o grupo controle, no respectivo período.

4.6 Expressão gênica de receptores de histamina no tecido pulmonar de camundongos, após o estímulo com histamina

A expressão gênica dos receptores de histamina (H_1R , H_2R , H_3R e H_4R) foi analisada por RT-PCR em tempo real (Figura 6). Observamos que a expressão de H_1R foi aumentada em camundongos estimulados com histamina 50 μM e 100 μM no período de 6 horas, enquanto que no período de 24 horas este aumento foi observado somente na concentração de 50 μM (Figura 6A). Por outro lado, a expressão de H_2R apresentou aumento nas concentrações de 100 μM e 10 μM , nos períodos de 6 e 24 horas respectivamente (Figura 6B). Já a expressão de H_3R , houve aumento somente no período de 6 horas na concentração de 100 μM (Figura 6C). Por fim, a expressão de H_4R apresentou aumento significativo na concentração de 50 μM , nos períodos de 6 e 24 horas, enquanto que em 48 o aumento foi evidente apenas na concentração de 10 μM (Figura 6D).

PULMÃO

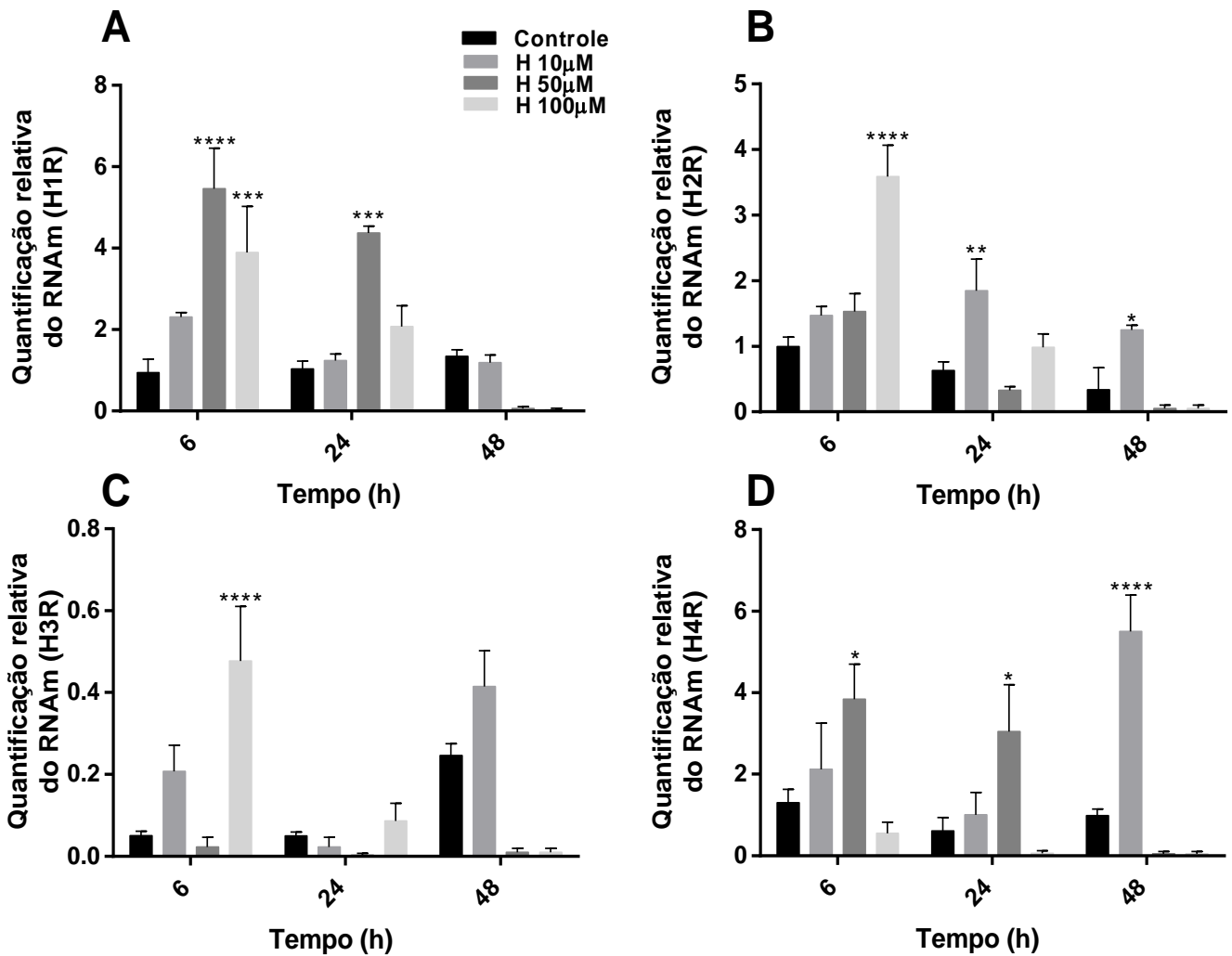


Figura 6. Expressão gênica dos receptores de histamina no tecido pulmonar de camundongos. Expressão gênica H_1R (A), H_2R (B), H_3R (C) e H_4R (D) nos grupos controle e histamina em diferentes concentrações (10, 50 e 100 μ M) e períodos (6, 24 e 48 horas). Dados são expressos como Média \pm EPM (n=6). Valores significativos representados por: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, quando comparados com o grupo controle, no respectivo período.

4.7 Histamina induz produção de muco no tecido pulmonar de camundongos

Em nosso estudo, após a instilação intratraqueal de histamina, avaliamos a resposta inflamatória e observamos alterações no tecido pulmonar, tais como aumento de células caliciformes e produção de muco (Figura 7). Na análise histológica do tecido pulmonar, observamos a produção de muco em todas as concentrações testadas de histamina, principalmente nas concentrações de 50 e 100 μ M, em todos os períodos analisados (Figura 7G-L). A hiperplasia das células caliciformes não foi observada nos grupos controle, mas foi observada nos camundongos estimulados com histamina nas diferentes concentrações.

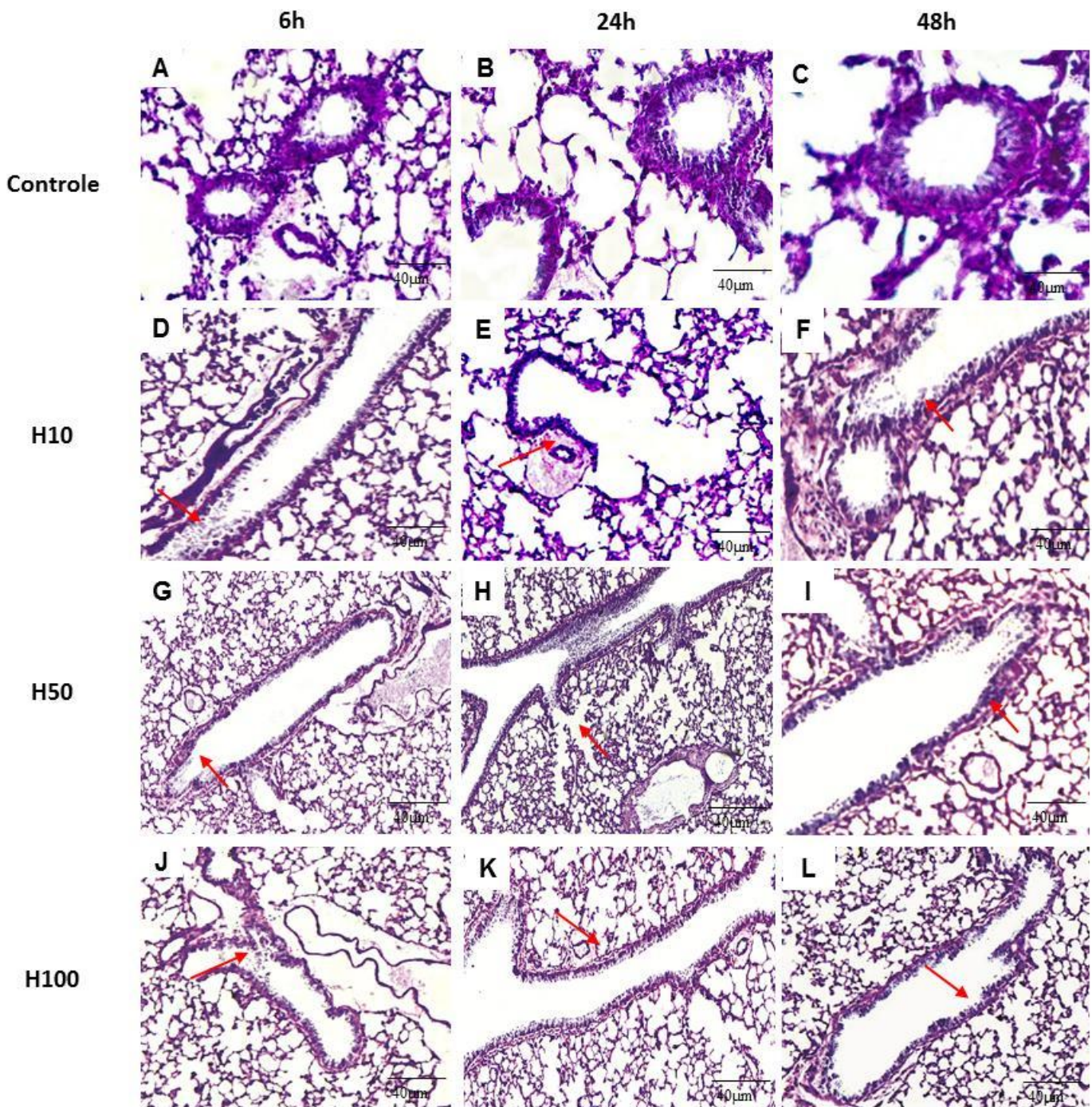


Figura 7. Histamina induz produção de muco, e expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* no tecido pulmonar de camundongos. Cortes histológicos de pulmão corados com *Alcian Blue/Periodic Acid Schiff* dos grupos controle e histamina (10, 50 e 100 μM) no período 6 horas (A, D, G, e H), 24 horas (B, E, H, e K), e 48 horas (C, F, I, e L). As setas indicam inflamação das vias aéreas com presença de células caliciformes e muco na parede interna do brônquio dos animais estimulados com histamina.

4.8 Histamina induz expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* no tecido pulmonar de camundongos

A produção de muco está associada à hiperplasia das células caliciformes, e a diferenciação dessas células pode ser mediada por *Gob-5* (Nakanishi, Morita et al. 2001). Sendo assim, evidenciamos aumento significativo na expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* em 24 horas, nas concentrações 50 e 100 μ M de histamina (Figuras 8A e B). Antes de evidenciarmos o período em que houve maior produção de muco e também maior expressão de *Muc5ac*, ocasionalmente alguns camundongos morreram, sugerindo que a função respiratória ficou comprometida após o estímulo com histamina (dados não demonstrados).

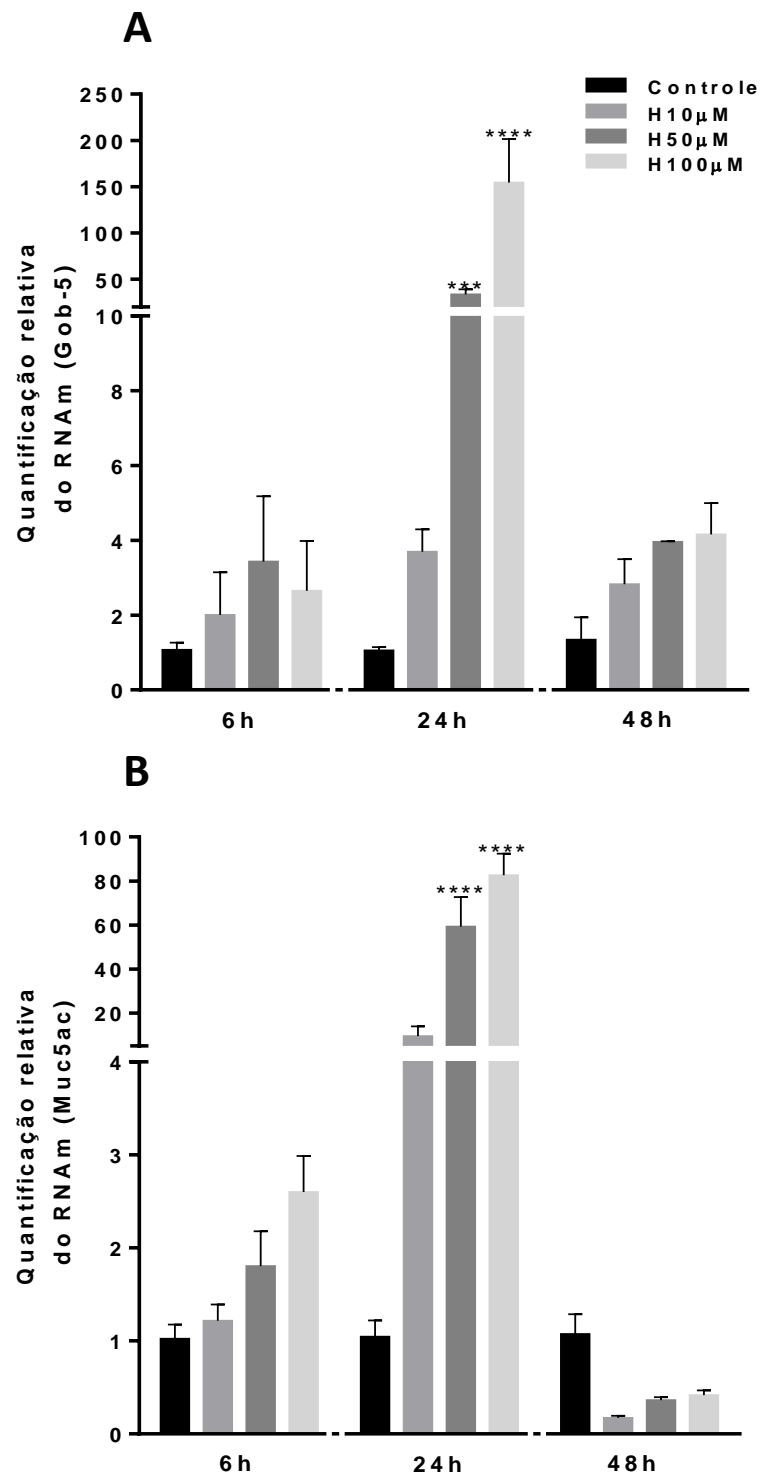


Figura 8. Histamina induz expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* no tecido pulmonar de camundongos. Expressão gênica de *Gob-5* (A) e *Muc5ac* (B). Dados são expressos como Média \pm EPM (n=6). Valores significativos estão representados por: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001, quando comparados com o grupo controle, no respectivo período.

4.9 Histamina induz deposição de colágeno e expressão gênica de *Col1a2* no tecido pulmonar de camundongos

Em nosso modelo experimental, observamos também anormalidades estruturais no tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina, tais como: componente vascular dilatado e congesto, edema, hipertrofia das fibras musculares e deposição excessiva de colágeno (Figuras 9D-L). Essas alterações contribuem para o espessamento e diminuição do parênquima pulmonar. Avaliando a expressão gênica de *Col1a2*, observamos que no período de 6 horas, nas concentrações 50 e 100 μM houve aumento significativo, em 24 horas houve aumento em todas as concentrações de histamina, enquanto que em 48 horas o aumento foi evidente somente na concentração de 100 μM (Figura 9M).

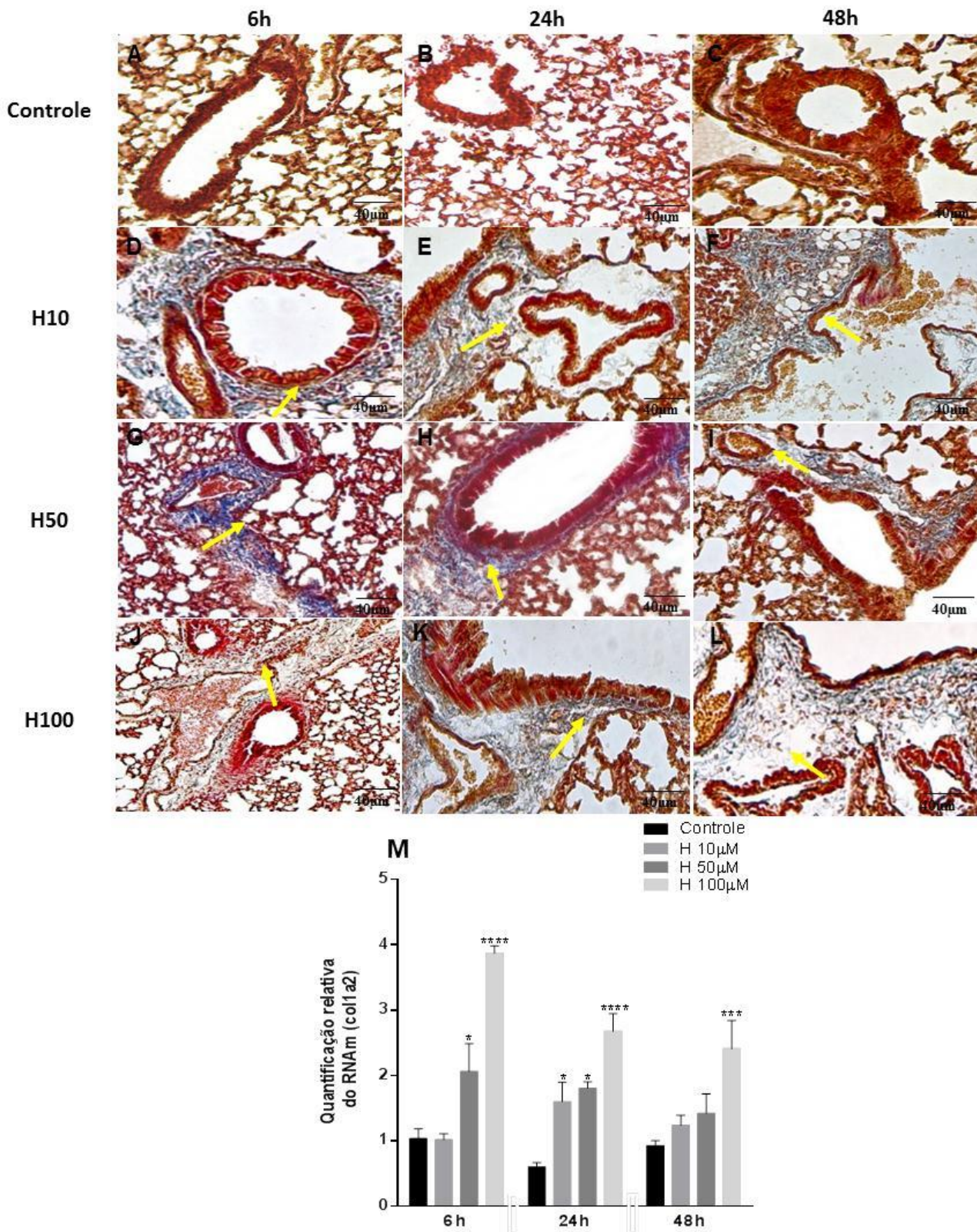


Figura 9. Histamina induz expressão gênica de Col1a2 e deposição de colágeno no tecido ulmonar de camundongos. Cortes histológicos de pulmão corados com Tricômio de Masson dos grupos controle e histamina (10, 50 e 100 µM) no período 6 horas (A, D, G, e H), 24 horas (B, E, H, e K), e 48 horas (C, F, I, e L). As setas indicam deposição de colágeno (corado em azul) no tecido pulmonar, nas regiões peribronquial e perivascular nos animais estimulados com histamina. Expressão gênica de Col1a2 (M). Dados são expressos como Média ± EPM (n=6). Valores significativos estão representados por: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, quando comparados com o grupo controle, no respectivo período.

4.10 DEX e/ou LOR diminui a migração de leucócitos no LBA e tecido pulmonar, de camundongos estimulados com histamina

A infiltração de células inflamatórias nas vias aéreas, evidente nos períodos de 6 e 24 horas após a instilação intratraqueal de histamina 50 μ M, foi nitidamente suprimida no LBA e no tecido pulmonar (Figura 10). LOR foi capaz de inibir parcialmente a migração de neutrófilos no LBA, mas não no tecido pulmonar às 6 horas (Figuras 10A e B). No entanto, em 24 horas, observamos que LOR diminuiu parcialmente a migração de neutrófilos no LBA (Figura 10A) e tecido pulmonar (Figura 10B). Por outro lado, o pré-tratamento com DEX isolada ou associada com LOR, foi capaz de diminuir o infiltrado neutrofílico no período de 6 e 24 horas no LBA e no pulmão, porém a associação farmacológica dessas drogas foi potencializada no pulmão. Apesar do efeito potente de DEX associada a LOR na migração de células inflamatórias para as vias aéreas, esta associação farmacológica não teve efeito significativo sobre a hiperplasia de células calciformes às 6 e 24 horas (Figuras 10K e L).

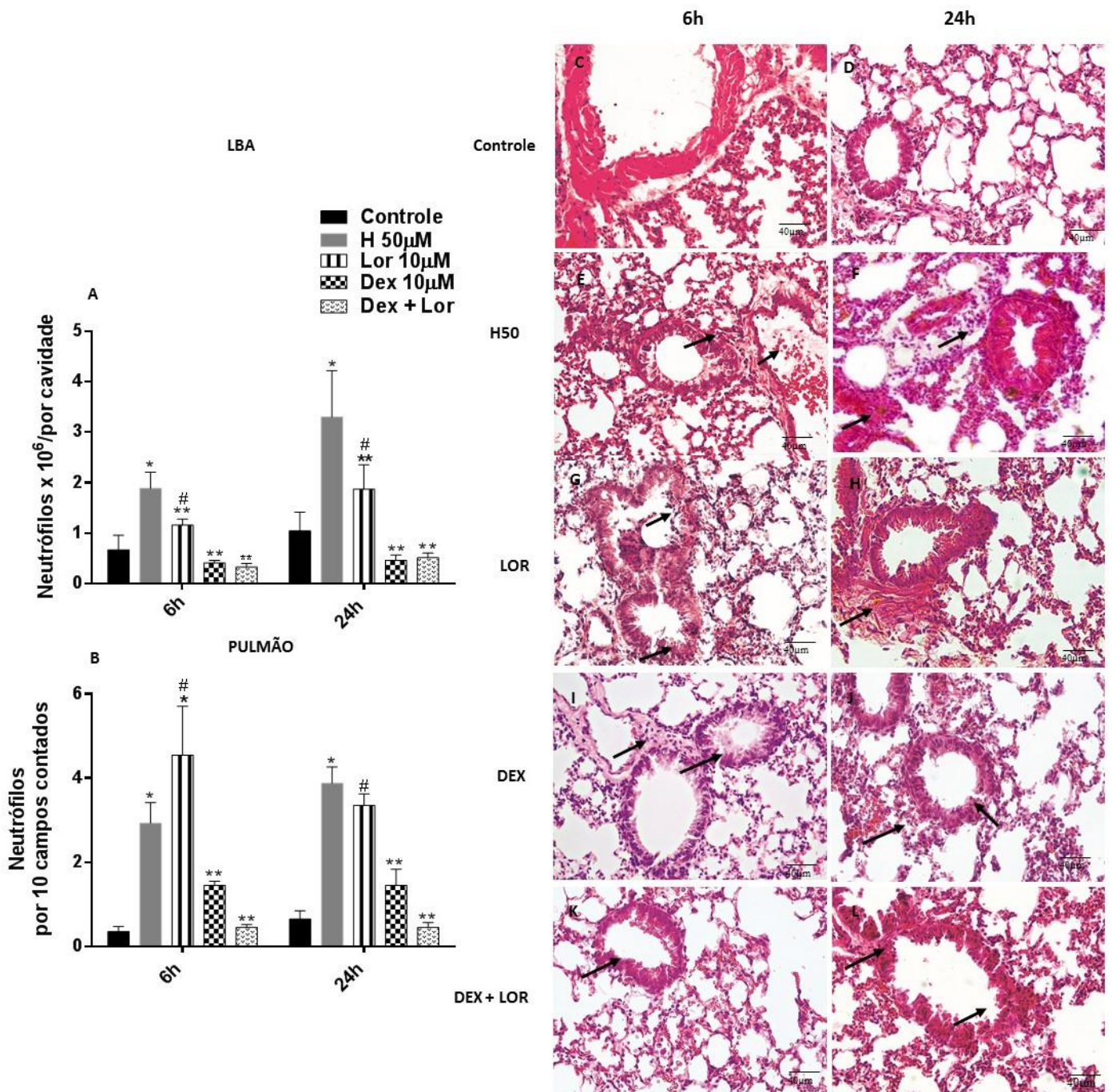


Figura 10. Efeitos da LOR e/ou DEX na migração de leucócitos no LBA e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina. Migração de Neutrófilos no LBA (A) e tecido pulmonar (B). Cortes histológicos do tecido pulmonar de camundongos, corados com H&E fotografadas com ampliação de 400x dos grupos controle (C e D), H50 (E e F), LOR (G e H), DEX (I e J), DEX + LOR (K e L) nos períodos de 6 e 24 horas. As setas indicam infiltrado leucocitário, presença de células caliciformes e obstrução bronquial. Dados são expressos como média \pm EPM (n=6). Os valores significativos são representados por: * $p < 0.05$ comparados com grupo controle; ** $p < 0.05$ comparados com grupo tratado com histamina 50 μM ; # $p < 0.05$ comparados drogas isoladas VS drogas associadas. H50= Histamina 50 μM ; LOR= Loratadina; DEX= Dexametasona e DEX+LOR=Dexametasona e Loratadina.

4.11 DEX e/ou LOR reduz alterações na traqueia de camundongos estimulados com histamina

No exame histológico da traqueia, observamos que a alteração estrutural induzida por histamina 50 μ M às 6 e 24 horas, tais como presença de glândulas mucosas, foi reduzida com DEX isolada ou associada a LOR (Figura 11). LOR isolada não demonstrou efeito benéfico nas alterações estruturais induzida pela histamina na traqueia (Figuras 11E e F), enquanto que o pré-tratamento apenas com DEX, ou a associação farmacológica de DEX e LOR, diminuiu a obstrução no lúmen traqueal, infiltração de leucócitos, reduziu a hipertrofia no músculo liso traqueal, bem como as glândulas mucosas (Figuras 11G-J).

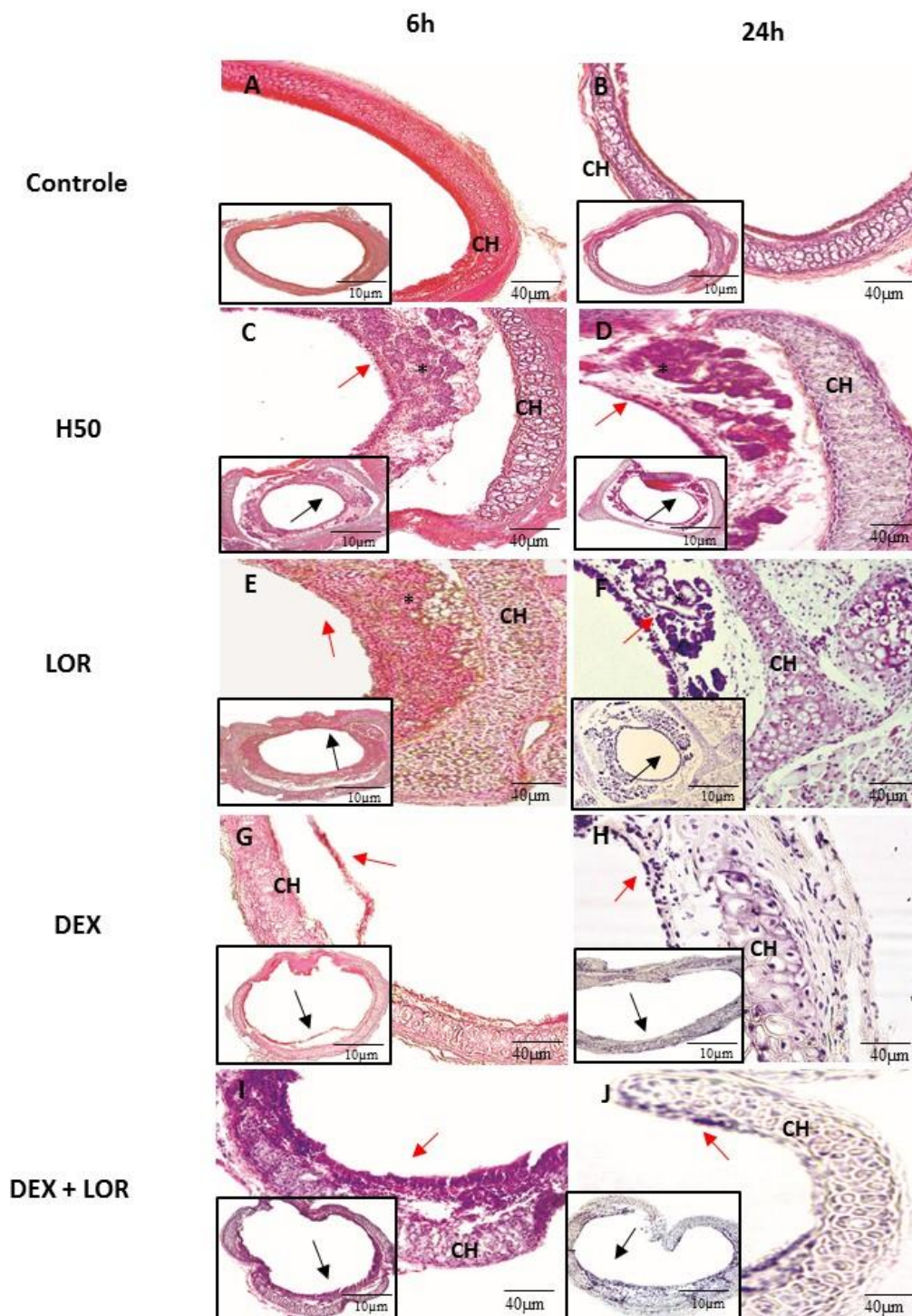


Figura 11. Efeitos da LOR e/ou DEX na traqueia de caudongos estimulados com histamina. Lâminas de microscopia coradas com H&E e fotografadas com ampliação de 100x e 400x dos grupos controle (A e B), H50 (C e D), LOR (E e F), DEX (G e H) e DEX+LOR (I e J) nos períodos 6 e 24 horas. As setas pretas indicam área danificada, obstrução da luz traqueal e perda severa da integridade epitelial; as vermelhas indicam tecido epitelial de revestimento pseudo-estratificado alterado, presença de células calciformes e infiltração leucocitária nos grupos estimulados com histamina. Os asteriscos indicam glândulas mucosas. CH: Cartilagem Hialina.

4.12 DEX e/ou LOR diminui os níveis de produção de SCF e CCL3 no LBA e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina

Os camundongos estimulados com histamina 50 μ M demonstraram aumento significativo nos níveis de SCF e CCL3 quando comparados com os grupos controle, tanto no LBA como no tecido pulmonar, nos períodos de 6 e 24 horas (Figura 12). No período de 6 horas, LOR e DEX, isoladas ou associadas, diminuiu a produção dos níveis de SCF e CCL3 no LBA, enquanto que em 24 horas LOR isolada não demonstrou diminuição significativa de SCF e CCL3 (Figuras 12A e B). Por outro lado, no tecido pulmonar houve diminuição dos níveis de SCF no grupo tratado com DEX associada a LOR, e de CCL3 nos grupos tratados com DEX isolada ou associada a LOR no período de 6 horas, enquanto que em 24 horas a associação farmacológica entre DEX e LOR diminui os níveis tanto SCF como de CCL3 (Figuras 12C e D).

LBA

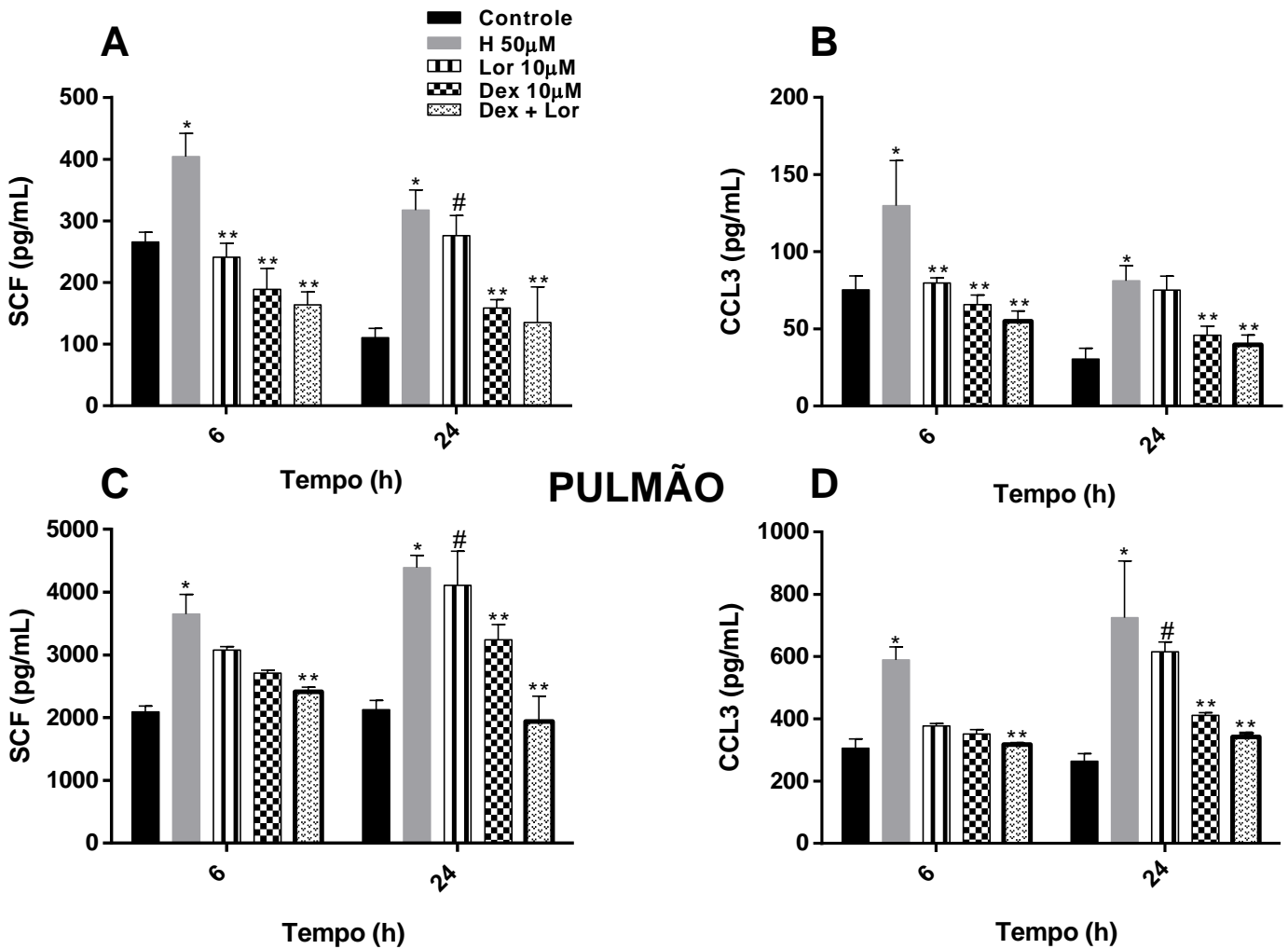


Figura 12. Efeitos de LOR e/ou DEX nos níveis de SCF e CCL3 no LBA e tecido pulmonar de camundongos estimulados com histamina. Níveis de SCF e CCL3 no LBA (A e B) e no tecido pulmonar (C e D) por ELISA. Dados são expressos como média \pm EPM (n=6). Valores significativos são representados por: *p<0.05 comparados com grupo controle; **p<0.05 comparados com grupo tratado com histamina 50 μ M; #p<0.05 comparados drogas isoladas VS drogas associadas. H5O= Histamina 50 μ M; LOR= Loratadina; DEX= Dexametasona e DEX+LOR=Dexametasona e Loratadina.

4.13 DEX diminui a expressão gênica de H_1R e H_4R

A expressão gênica de H_1R e H_4R foi analisada por RT-PCR em Tempo Real (Figura 13). A expressão de H_1R e H_4R foi observada em camundongos estimulados por instilação intratraqueal de histamina 50 μM , nos períodos de 6 e 24 horas. LOR diminuiu a expressão gênica de H_1R , enquanto que DEX isolada ou associada a LOR suprimiu a expressão de H_1R nos períodos analisados (Figura 13A). O pré-tratamento com DEX, isolada ou associada, diminuiu significativamente a expressão de H_4R nos períodos de 6 e 24 horas, no entanto LOR (antagonista de H_1R) não afetou a expressão de H_4R (Figura 13B).

PULMÃO

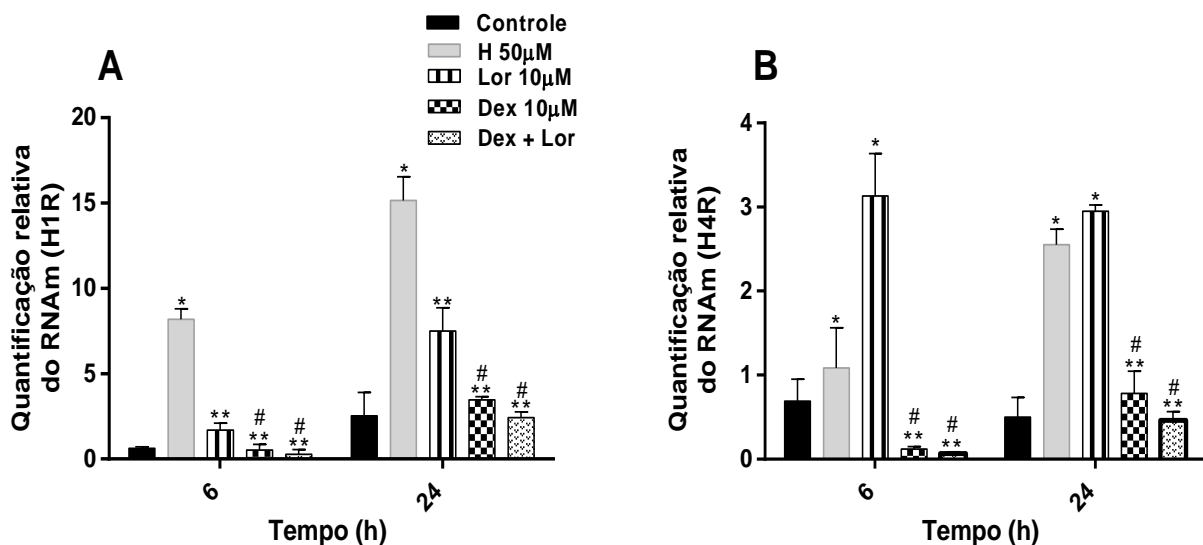


Figura 13. DEX diminui a expressão gênica de H_1R e H_4R de camundongos estimulados com histamina. Expressão gênica de H_1R (A) e H_4R (B) avaliada em 6 e 24 horas após a instilação intratraqueal de histamina 50 μM . Dados são expressos como Média \pm EPM (n=6). Valores significativos são representados por: *p<0.05 comparados com grupo controle; **p<0.05 comparados com grupo tratado com histamina 50 μM ; #p<0.05 comparados drogas isoladas VS drogas associadas. H50= Histamina 50 μM ; LOR= Loratadina; DEX= Dexametasona e DEX+LOR=Dexametasona e Loratadina.

4.14 DEX diminui a produção de muco no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina

Os camundongos estimulados por instilação intratraqueal de histamina 50 μ M, pré-tratados com DEX e/ou LOR não demonstraram efeito significativo sobre a hiperplasia de células caliciformes, porém demonstraram redução nas alterações vasculares (Figuras 14A-J). Quanto a presença de muco no tecido pulmonar após o estímulo com histamina, identificamos que os animais pré-tratados com DEX isolada, ou associada com LOR, apresentaram diminuição considerável em relação aos animais que não receberam tratamento (Figura 14G-J).

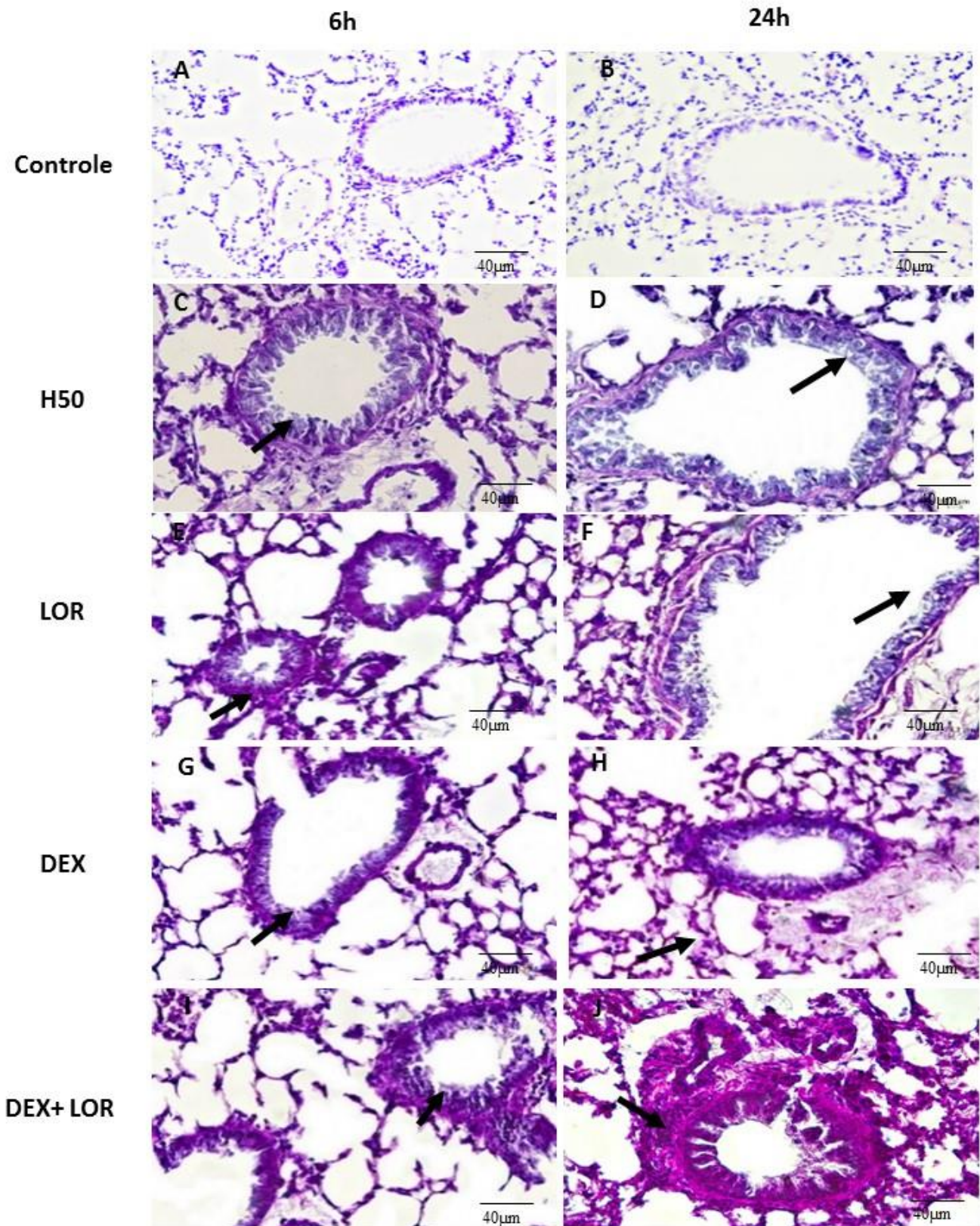


Figura 14. Efeitos da LOR e/ou DEX na produção de muco em camundongos estimulados por histamina 50 μ M, nos períodos de 6 e 24 horas. Cortes histológicos de pulmão corados com *Alcian Blue/Periodic Acid Schiff* (A-J). As setas pretas demonstram intensa inflamação das vias aéreas, hiperplasia de células caliciformes e produção de muco.

4.15 DEX e/ou LOR inibe a expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina

O aumento significativo da expressão gênica de *Gob-5* vista em 24 horas, após o estímulo com histamina, foi diminuída significativamente em camundongos pré-tratados com DEX e/ou LOR (Figuras 15A). Já a expressão gênica de *Muc5ac*, observada no mesmo período que *Gob-5*, demonstrou diminuição nos grupos pré-tratados com DEX isolada ou associada com LOR (Figura 15B).

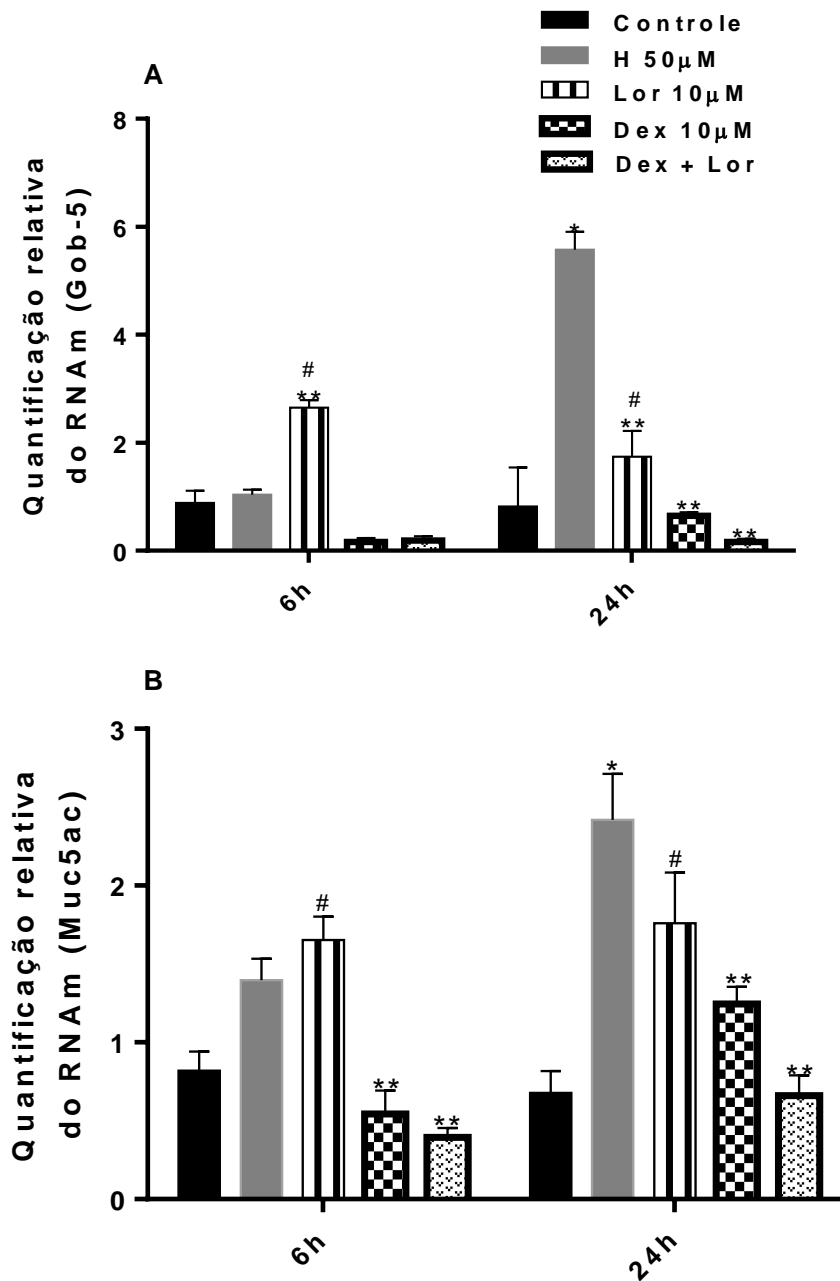


Figura 15. Efeitos da LOR e/ou DEX na expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* em camundongos estimulados por histamina 50µM, nos períodos de 6 e 24 horas. Expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac*, após instilação intratraqueal de histamina 50 µM, nos períodos 6 e 24 horas (A e B). Dados são expressos como Média ± EPM (n=6). Valores significativos representados por: *p<0.05 comparados com grupo controle; **p<0.05 comparados com grupo tratado com histamina 50 µM; #p<0.05 comparados drogas isoladas VS drogas associadas. H50= Histamina 50µM; LOR= Loratadina; DEX= Dexametasona e DEX+LOR=Dexametasona e Loratadina.

4.16 DEX e/ou LOR diminui a deposição de colágeno no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina

Os camundongos estimulados por instilação intratraqueal de histamina 50 μ M, pré-tratados com DEX e/ou LOR demonstraram redução nas alterações vasculares, edema e na deposição de colágeno no tecido pulmonar, tanto na área peribronquial quanto na área perivascular (Figuras 16A-J). Quanto a expressão gênica de Col1a2, observamos que os animais pré-tratados com DEX e/ou LOR demonstraram diminuição significativa, em ambos os períodos avaliados (Figura 16 K).

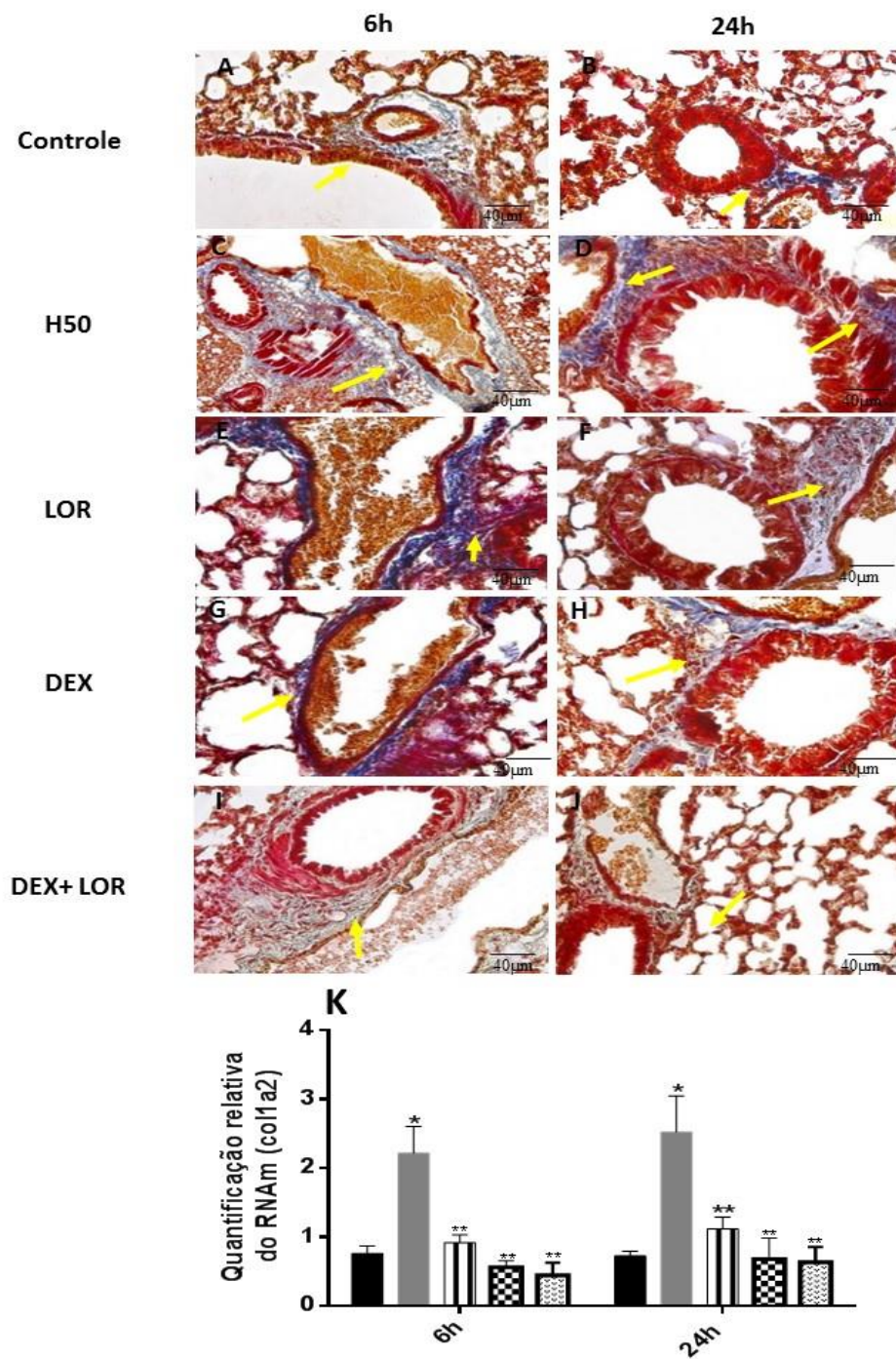


Figura 16. Efeitos da LOR e/ou DEX na deposição de colágeno e expressão gênica de *Col1a2* no tecido pulmonar de camundongos estimulados por histamina 50 μ M, nos períodos de 6 e 24 horas. Cortes histológicos de pulmão corados com Tricômio de Masson (A-J). As setas amarelas indicam a deposição de colágeno (corado em azul) nas regiões peribronquial e perivascular. Expressão gênica de *Col1a2*, após instilação intratraqueal de histamina 50 μ M, nos períodos 6 e 24 horas (K). Dados são expressos como Média \pm EPM (n=6). Valores significativos representados por: *p<0.05 comparados com grupo controle; **p<0.05 comparados com grupo tratado com histamina 50 μ M; #p<0.05 comparados drogas isoladas VS drogas associadas.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a histamina foi capaz de induzir inflamação das vias aéreas, caracterizada por migração de leucócitos, produção de SCF e CCL3, alterações na traqueia e no tecido pulmonar, tais como hiperplasia de células caliciformes, produção de muco e deposição de colágeno; e todos esses efeitos podem estar sendo mediados pelos receptores H_1 e/ou H_4 .

O modelo murino utilizado em nosso estudo demonstrou que a histamina é um potente indutor de inflamação das vias aéreas. Os animais estimulados com histamina em diferentes concentrações, por técnica cirúrgica, demonstraram migração de leucócitos no LBA e no tecido pulmonar. Poucos estudos utilizam histamina como um indutor inflamatório (Kondo, Nakata et al. 2012). A maioria dos estudos utilizam diferentes alérgenos, como ovalbumina (OVA), extratos de ácaro (HDM), *Alternaria alternata* ou baratas (Sarpong, Zhang et al. 2003, Johnson, Wiley et al. 2004, Cicmil 2013), enquanto que a ação direta da histamina (mediador inflamatório) é pouco explorada em modelos experimentais de inflamação das vias aéreas. Considerando essas evidências, e o fato de que a histamina orchestra importantes eventos da cascata inflamatória, reveste-se de importância compreender e avaliar os seus efeitos na resposta inflamatória pulmonar.

A histamina induziu a migração de neutrófilos no LBA (Fig. 1A), bem como no tecido pulmonar (Fig. 3A). Sendo que o pico dessas células ocorreu nos períodos de 6 e 24 horas após o estímulo. A migração de neutrófilos no LBA observado neste estudo foi consistente com estudos prévios em modelo de exposição aguda ao HDM, porém esses estudos demonstraram declínio na infiltração neutrofílica enquanto os nossos dados demonstraram que pelo menos

24 horas após instilação intratraqueal de histamina houve aumento persistente de neutrófilos (Piyadasa, Altieri et al. 2016). Outro estudo usando *Alternaria alternata*, alergéno fúngico ligado ao desenvolvimento de asma severa, observou recrutamento de células inflamatórias com predominante população de neutrófilos no LBA e também no tecido pulmonar, corroborando com os nossos resultados (Cicmil 2013). Esses dados sugerem que a histamina possa ter ativado receptores H₁ expressos nas células endoteliais vasculares, promovendo assim o aumento na expressão de moléculas de adesão, tal como P-selectina, E-selectina e ICAM-1, as quais favorecem a migração leucocitária para o foco inflamatório, ou então a histamina pode ter aumentado a produção de fatores quimiotáticos por células residentes. Vale ressaltar que não há relatos sobre o componente celular envolvido na resposta inflamatória das vias aéreas induzida pela histamina.

Além dos neutrófilos, a histamina induziu a migração de células mononucleares no LBA (Fig. 1B) e no tecido pulmonar (Fig. 3B). Este evento já foi documentado em modelos de asma brônquica, tanto em humanos (Falcai, Soeiro-Pereira et al. 2015) como em murinos (Temelkovski, Hogan et al. 1998, Henderson, Chi et al. 2002). As células mononucleares e seus produtos podem desempenhar um importante papel na patogênese da asma. Estudos anteriores demonstram que as células mononucleares podem liberar mediadores inflamatórios, como IL-4 e IL-12, os quais podem agravar o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas (Meyts, Hellings et al. 2006, Falcai, Soeiro-Pereira et al. 2015). Sabe-se que a infiltração de células mononucleares no processo inflamatório das vias aéreas, reflete uma reação persistente à agressão tecidual, com posterior tentativa de reparação, ou seja, a presença dessas células em nosso modelo sugere que a histamina não só induz inflamação, como também

pode ser responsável pela antecipação de eventos vistos preferencialmente em modelos crônicos, como é o caso do processo de remodelamento das vias aéreas. Já a migração de eosinófilos para o lúmen das vias aéreas, foi observada somente 48 horas após o estímulo com histamina, o que já esperado, uma vez que a predominância dessas células é demonstrada em modelos crônicos (Johnson, Wiley et al. 2004).

Considerando que a função pulmonar pode ser potencialmente afetada em muitos pacientes com distúrbios inflamatórios nas vias aéreas, observamos que a histamina promoveu alterações estruturais no tecido pulmonar (Fig. 2D-L). Além disso, induziu danos à traqueia, tais como espessamento da musculatura lisa, edema e obstrução do lúmen traqueal, o que pode agravar a resposta inflamatória (Fig. 4D-L). Já foi relatado que a estimulação das vias aéreas por mediadores inflamatórios, bem como o acúmulo de células inflamatórias e a hipertrofia do músculo liso podem contribuir para o estreitamento do lúmen brônquico e traqueal (Ebina, Takahashi et al. 1993). A investigação sobre alterações na traqueia, devido a inflamação alérgica, é escassa; há poucos estudos que avaliam as alterações estruturais e danos na traqueia (Teng, Wang et al. 2008, Kondo, Nakata et al. 2012). Estudos anteriores avaliaram mudanças na traqueia envolvendo histamina (Jacques, Spur et al. 1991, Wells, Hanafi et al. 1996, Gourgoulianis, Iliodromitis et al. 1998), porém até o momento os nossos achados são os primeiros a demonstrar alterações no tecido pulmonar e na traqueia, concomitantemente, em modelo murino de inflamação das vias aéreas induzido por histamina. Outros autores demonstram apenas alterações estruturais no tecido pulmonar, sem alterações estruturais na traqueia. No que se refere as alterações pulmonares, há na literatura modelos crônicos que evidenciam

inflamação pulmonar, caracterizada por alterações estruturais, hiperplasia de células caliciformes e migração de leucócitos, porém os autores relatam que essas alterações ocorreram antes da migração de eosinófilos (Blyth, Pedrick et al. 1996). Da mesma forma, em nosso estudo, as alterações estruturais no tecido pulmonar e na traqueia ocorreram antes da migração dos eosinófilos, uma vez que identificamos que houve maior migração de neutrófilos e mononucleares. Esses resultados sugerem a importância de estudar a etiologia de doenças respiratórias em que há a migração de neutrófilos, o que caracteriza uma desordem aguda e não-atópica, e também investigar se células residentes como células mononucleares age amplificando o processo inflamatório. A compreensão desses eventos contribuiria com o tratamento e a prevenção dessas doenças, considerando que a maioria dos estudos são estritamente voltados para desordens atópicas, em que há maior predominância de eosinófilos.

A migração de leucócitos no LBA e no tecido pulmonar observado em nosso modelo pode ser desencadeada diretamente pela histamina, ou pode ter a participação de outros mediadores inflamatórios, como já mencionado. Neste estudo, observamos que a histamina induziu a produção de SCF e CCL3 (Fig.5). Estudos anteriores demonstram que CCL3 contribui para a migração de neutrófilos para o epitélio das vias aéreas, usando diferentes receptores de quimiocinas (Lloyd 2002, Ramos, Canetti et al. 2005), além disso há relatos de que a ativação de H₄ em células NK induz a produção de CCL3 (MOMMERT et al., 2015). Já o papel de SCF na inflamação pulmonar foi descrito anteriormente; na literatura, os autores demonstram que a hiperresponsividade das vias aéreas induzidas por SCF depende da ativação de mastócitos em camundongos normais (Campbell, Hogaboam et al. 1999). Além disso, outros estudos mostram que SCF

estimula células do músculo liso traqueal a produzir TGF- β e FGF-2, mediada pela produção de CCL3 (Oliveira, Danilucci et al. 2016). Outros resultados sugerem que SCF induz hiperplasia das células caliciformes, favorecendo a produção de muco, e que essa citocina apresenta níveis elevados em casos de asma, demartite atópica e rinite alérgica (Da Silva, Reber et al. 2006). Esse aumento na produção de SCF e CCL3 em nosso estudo sugere que a histamina poderia engatilhar a liberação desses mediadores, provavelmente pela ativação de H_1 e/ou H_4 , e conseqüentemente induzir a migração de leucócitos, amplificando a resposta inflamatória das vias aéreas.

O efeito da histamina sobre o processo alérgico é dependente de receptores específicos (H_1 , H_2 , H_3 e H_4), sendo que H_4 foi recentemente descrito e há poucos estudos sobre os efeitos desse receptor (O'Reilly, Alpert et al. 2002). A ligação da histamina a esses receptores produz efeitos que podem agravar a resposta inflamatória. Em nosso estudo, observamos aumento da expressão gênica de H_1 e H_4 às 6 e 24 horas após a resposta inflamatória induzida por histamina (Fig. 6). Isso sugere que esses receptores estão envolvidos em nosso modelo inflamatório das vias aéreas. Estudos demonstram que a histamina é capaz de induzir broncoespasmo através do receptor H_1 , e que H_4 participa de respostas do tipo Th1, promovendo a quimiotaxia de células inflamatórias, tais como neutrófilos, células dendríticas e mastócitos (White 1990, Takeshita, Sakai et al. 2003). Além disso, estudos *in vivo* demonstraram que H_4 atua como mediador da resposta inflamatória (Takeshita, Sakai et al. 2003, Thurmond, Desai et al. 2004, Varga, Horvath et al. 2005, Dunford, O'Donnell et al. 2006). Coletivamente, esses achados recentes e os nossos dados, conduzem a uma

reavaliação do papel da histamina e de seus receptores nas respostas imunes/inflamatórias.

A hiperresponsividade das vias aéreas (ou brônquica) é uma característica importante na inflamação aguda e crônica das vias aéreas, e consiste numa resposta broncoconstritora exagerada em resposta a um estímulo (Johnson, Wiley et al. 2004). A produção de muco também pode intensificar a broncoconstrição. Nesse estudo, observamos que a histamina além de induzir migração de leucócitos, também induz a produção de muco no tecido pulmonar (Fig.7). Também evidenciamos que o pico da expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* foi em 24 horas após o estímulo com histamina em altas concentrações (Fig. 8). O aumento da expressão de *Muc5ac* pode estar diretamente relacionado ao aumento da expressão de *Gob-5*, uma vez que estudos anteriores demonstraram que canais de cloreto dependentes de cálcio 1 (CLCA1) presentes no epitélio das vias aéreas estão envolvidos na diferenciação de células caliciformes, aumentando assim a produção de muco (Toda, Tulic et al. 2002). No entanto, há controvérsias de que a expressão dos genes *Muc5ac* e *Gob-5* é regulada de forma independente, ou seja, pode haver aumento de expressão de *Muc5ac* sem que haja aumento da expressão de *Gob-5* (Kondo, Tamaoki et al. 2002, Thai, Chen et al. 2005). Estudos anteriores revelam que a instilação intratraqueal de IL-13 em camundongos induz a expressão gênica de *Muc5ac* e *Gob-5* após 24 horas, e esses resultados corroboram com os nossos achados (Thai, Chen et al. 2005). Contudo, nossos resultados sugerem que a histamina esteja ativando a produção e liberação de citocinas importantes na produção de muco, como por exemplo IL-13.

Além do processo inflamatório causado pela histamina em nosso estudo, observamos que existem outros eventos que levam ao declínio a função pulmonar.

Paralelamente ao processo inflamatório, observamos que a histamina induziu a deposição de colágeno e expressão gênica de *Col1a2*, caracterizando o processo de remodelamento das vias aéreas (Fig. 9). Estudos anteriores utilizando modelo alérgico agudo desafiado com HDM, observaram inflamação pulmonar e remodelamento das vias aéreas sem deposição de colágeno (Piyadasa, Altieri et al. 2016). O modelo utilizado em nosso estudo é o primeiro a demonstrar inflamação e remodelamento das vias aéreas com deposição de colágeno, concomitantemente. Sendo assim, o nosso modelo experimental pode ser usado para compreender os mecanismos envolvidos no remodelamento das vias aéreas, uma vez que é importante encontrar novas estratégias terapêuticas que possam prevenir ou diminuir o dano epitelial das vias aéreas.

Considerando que a histamina é um importante mediador que participa de vários eventos essenciais da resposta imune, e influencia numerosas funções de células do sistema imunológico (Casale, Wood et al. 1987), o uso de anti-histamínicos tem sido avaliado em diferentes modelos experimentais, e demonstrado efeitos benéficos sobre o processo inflamatório (Fireman, Skoner et al. 1987, Kaneta, Yanaguimoto et al. 1993). Em nosso estudo, a resposta inflamatória evidenciada nos períodos 6 e 24 horas após estímulo com histamina apresentou divergência com o uso de loratadina (antagonista de receptor H_1), ou seja, LOR inibiu parcialmente a migração de neutrófilos no LBA mas não no tecido pulmonar (Fig.10). Esses resultados sugerem que a histamina está parcialmente envolvida a migração de leucócitos no LBA, mas não no tecido pulmonar, e que outros mediadores inflamatórios, tais como SCF e CCL3, podem estar envolvidos. Outros estudos investigaram a capacidade da LOR em inibir a resposta alérgica em animais (Kreutner, Chapman et al. 1987) e em humanos (Town and Holgate 1990,

Andersson, Nolte et al. 1991). Por outro lado, também há evidências de que LOR é efetiva na inflamação das vias aéreas apenas quando associada a outra droga, como anti-leucotrienos e glicocorticóides (Corren, Harris et al. 1997, Benitez, Arvizu et al. 2005).

Os glicocorticóides são os mais utilizados, porque diminuem a inflamação das vias aéreas por múltiplos mecanismos, embora existam evidências de resistência aos glicocorticóides em doenças como Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Barnes 2000), choque séptico (Bone, Fisher et al. 1987) e fibrose pulmonar idiopática (Davies, Richeldi et al. 2003). Além disso, estudos demonstram que corticóides inibem indiretamente vários tipos de células inflamatórias e também a ativação de linfócitos T, conseqüentemente inibe a liberação de citocinas e quimiocinas responsáveis pelo agravamento do processo inflamatório das vias aéreas (Jaffuel, Mathieu et al. 1999, Belvisi 2004). Em nosso estudo, observamos que DEX foi capaz de inibir a migração de neutrófilos no LBA e no tecido pulmonar, sugerindo que possivelmente a histamina tenha ativado a migração dessas células de modo indireto, ou seja, com a participação de outros mediadores inflamatórios, os quais foram liberados após o estímulo, tais como SCF e/ou CCL3.

As alterações estruturais observadas tanto na traqueia quanto no tecido pulmonar, após o estímulo com histamina, foram reduzidas de forma significativa nos animais pré-tratados com DEX (Figs. 10 e 11). Sabe-se que as alterações nas vias aéreas podem ser decorrentes da interação de diversos componentes do sistema imunológico, tais como células e uma gama de mediadores inflamatórios. Há evidências na literatura de que a DEX é capaz de reduzir a lesão pulmonar aguda causada por diferentes alérgenos, e também por ventilação mecânica em modelo experimental (Ramsay et al, 1998; Otha et al., 2001), porém não constam relatos

sobre os efeitos desse glicocorticoide na traqueia após desafio com histamina, o que faz dos nossos dados relevantes. A redução das alterações estruturais na traqueia e no pulmão, devido ao uso de dexametasona, podem ter se dado por dois mecanismos: inibição da quimiotaxia e ativação de leucócitos nos pulmões, ou então pela inibição de fatores de transcrição que promovem a liberação de citocinas e quimiocinas. Visto que os corticóides efetivamente inibem ambos os mecanismos, reduzindo assim o influxo de leucócitos para as vias aéreas e sua ativação, inibindo ou minimizando assim lesões, esses efeitos poderiam explicar os nossos achados, que demonstraram que os animais pré-tratados com DEX apresentaram lesão traqueal e pulmonar mais leve.

Muitos mediadores inflamatórios são produzidos durante o processo inflamatório das vias aéreas. Observamos que os níveis elevados de SCF e CCL3 às 6 horas, foram diminuídos com DEX e/ou LOR no LBA, e que o pré-tratamento com LOR não demonstrou redução significativa de SCF e CCL3 às 24 horas, tanto no LBA como no tecido pulmonar (Fig.12). Há outros relatos que demonstram que o uso de anti-histamínicos, como a terfenadina, reduz os sintomas e melhora a função pulmonar na asma leve e moderada, e que LOR não produz melhora significativa, exceto quando associada à pseudoefedrina, o que melhora significativamente os sintomas da asma, inclusive o fluxo respiratório (Rafferty, Jackson et al. 1990, Corren, Harris et al. 1997). Assim, a redução observada de SCF e CCL3 em nosso estudo, pode ser atribuída ao fato de que os corticóides inibem vários aspectos do processo inflamatório, diminuindo a transcrição de genes e, conseqüentemente, inibindo a transcrição da maioria das citocinas e quimiocinas consideradas importantes na patogênese de doenças respiratórias.

No que se refere a expressão de receptores de histamina, vimos que os camundongos pré-tratados com DEX isolada, ou associada com LOR, demonstram diminuição na expressão dos receptores H_1R e H_4R (Fig. 13). Visto que os receptores de histamina são expressos em várias células do contingente leucocitário, como neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos (Bachert et al., 2001), e que glicocorticoides são capazes de inibir a expressão de diversos receptores (Hu et al, 2009) e moléculas de adesão (Ilanamura et al., 2001) importantes na resposta inflamatória, esses resultados reforçam a efetividade desses fármacos na resposta inflamatória das vias aéreas, e explica a redução da maioria dos eventos desencadeados, direta ou indiretamente, pela histamina em nosso modelo. Considerando também que a associação de antagonistas de H_1 e glicocorticoides é muito utilizada na prática clínica, e não há uma lógica clara sobre isso, é de extrema importância estudos mais detalhados sobre o tema.

A hiperplasia de células caliciformes e a superprodução de muco são características importantes de muitas doenças das vias aéreas, como asma, bronquite crônica e fibrose cística (Cohn 2006). Estudos anteriores mostram que *Gob-5* pode desempenhar papel regulatório na produção de muco (Nakanishi, Morita et al. 2001). Observamos que a expressão gênica de *Gob-5* e *Muc5ac* atingiu o pico em 24 horas, e que ambos biomarcadores foram diminuídos em animais pré-tratados com DEX e/ou LOR (Fig.15). Estudos *in vivo* demonstram que os glicocorticóides diminuem a expressão de *Muc5ac* em células NCI-H292 (Kai, Yoshitake et al. 1996) e também em células A59 (células de adenocarcinoma de pulmão humano) (Lu, Lillehoj et al. 2005). Essa diminuição da expressão de *Muc5ac*, em nosso modelo, pode estar envolvida na inibição direta da produção de muco por células epiteliais

das vias aéreas, que se mostram diminuídas nos cortes histológicos de camundongos estimulados por histamina e pré-tratados com DEX (Fig.14), ou indiretamente pela inibição de mediadores inflamatórios que estimulam a produção de muco.

Os mediadores envolvidos na inflamação pulmonar podem atingir o epitélio, causando danos. Conseqüentemente, as células epiteliais das vias aéreas iniciam a deposição intersticial de colágeno, o que explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes com asma (Cokugras, Akcakaya et al. 2001). Em nosso estudo, observamos diminuição da expressão gênica de *Col1a2* e na deposição de colágeno no tecido pulmonar, bem como redução nas alterações estruturais do tecido pulmonar e traqueia em camundongos pré-tratados com DEX e/ou LOR (Fig.16). Estudos anteriores em modelos de asma aguda e/ou crônica demonstram que o colágeno é um dos constituintes do remodelamento das vias aéreas, e que interfere na arquitetura das vias aéreas, levando a obstrução irreversível do fluxo de ar (Gonzalez-Avila, Bazan-Perkins et al. 2016). A maioria dos modelos crônicos apresentam a relação existente entre recrutamento de eosinófilos e alteração estrutural pulmonar com deposição de colágeno, no entanto, poucos estudos mostram a capacidade dos neutrófilos em cooperar no processo de remodelamento das vias aéreas. Desta forma, em nosso modelo não-atópico de inflamação das vias aéreas desencadeada pela histamina, sugerimos que a migração de neutrófilos pode contribuir com as alterações estruturais no tecido pulmonar, inclusive com deposição de colágeno. Essas alterações observadas em nosso estudo foram reduzidas em animais pré-tratados com DEX. Corroborando com os nossos resultados, autores demonstram que DEX inibe alterações estruturais das vias aéreas, prevenindo o

processo de remodelamento pulmonar, bem como reduz a deposição de colágeno (Dik, McAnulty et al. 2003, Huang, Wang et al. 2014). Nossas descobertas são importantes para entender a etiologia do remodelamento na inflamação das vias aéreas, pois demonstramos que a inflamação e remodelamento das vias aéreas ocorrem concomitantemente após o estímulo com histamina.

Em síntese, com dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a histamina induz inflamação nas vias aéreas de camundongos, caracterizada por migração de leucócitos, produção de SCF e CCL3, além de causar alterações estruturais na traqueia e no tecido pulmonar, com possível participação dos receptores H_1 e/ou H_4 , tais como hiperplasia de células caliciformes, produção de muco e deposição de colágeno. Em conjunto, esses dados reforçam a ideia de que a histamina modula a função pulmonar de diferentes maneiras, e isso faz com que os efeitos dessa amina na fisiopatologia de doenças respiratórias mereça investigações mais aprofundadas.

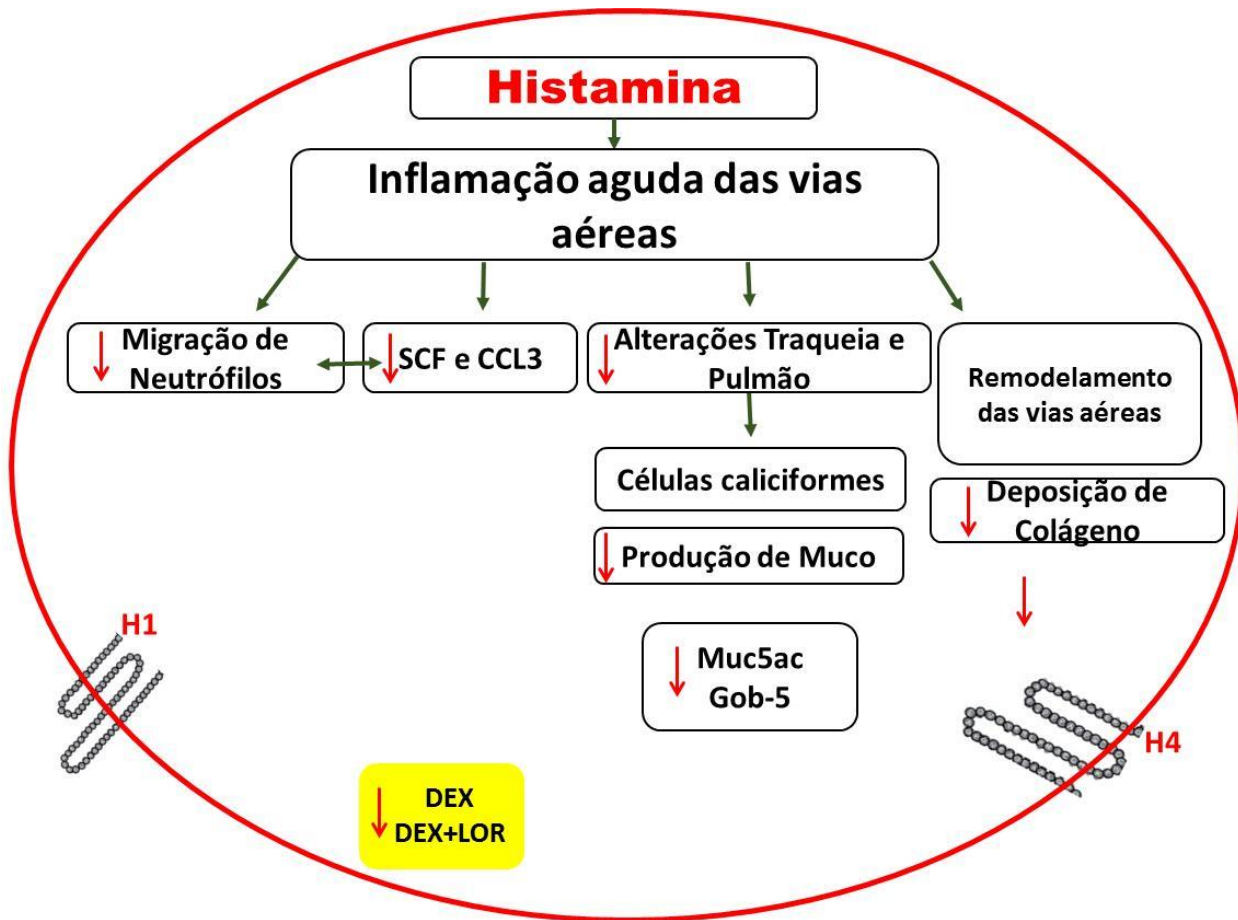


Figura 17. Diagrama esquemático dos efeitos da histamina em modelo murino de inflamação das vias aéreas. Histamina induz inflamação aguda das vias aéreas, caracterizada por migração de neutrófilos, produção de SCF e CCL3, causa alterações estruturais na traqueia e no tecido pulmonar, tais como hiperplasia de células caliciformes, produção de muco e deposição de colágeno. Coletivamente, todos esses efeitos contribuem com o remodelamento das vias aéreas. O pré-tratamento com dexametasona, isolada ou associada à loratadina, inibe significativamente os eventos desencadeados pela histamina nas vias aéreas de camundongos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a histamina induz inflamação nas vias aéreas caracterizada por migração de leucócitos, produção de SCF e CCL3, além de causar alterações estruturais traqueia e no tecido pulmonar, com possível participação dos receptores H₁ e/ou H₄, tais como hiperplasia de células caliciformes, produção de muco e deposição de colágeno.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- (2006). "[IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]." J Bras Pneumol **32 Suppl 7**: S447-474.
- Abraham, S. N. and R. Malaviya (1997). "Mast cells in infection and immunity." Infect Immun **65**(9): 3501-3508.
- Aguado, C., S. Garcia-Madrona, M. Gil-Minguez and R. Lujan (2016). "Ontogenic Changes and Differential Localization of T-type Ca(2+) Channel Subunits Cav3.1 and Cav3.2 in Mouse Hippocampus and Cerebellum." Front Neuroanat **10**: 83.
- Ajuebor, M. N., A. M. Das, L. Virag, R. J. Flower, C. Szabo and M. Perretti (1999). "Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10." J Immunol **162**(3): 1685-1691.
- Alam, R., J. York, M. Boyars, S. Stafford, J. A. Grant, J. Lee, P. Forsythe, T. Sim and N. Ida (1996). "Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients." Am J Respir Crit Care Med **153**(4 Pt 1): 1398-1404.
- Andersson, M., H. Nolte, C. Baumgarten and U. Pipkorn (1991). "Suppressive effect of loratadine on allergen-induced histamine release in the nose." Allergy **46**(7): 540-546.
- Barnes, P. J. (2000). "Inhaled corticosteroids are not beneficial in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **161**(2 Pt 1): 342-344; discussion 344.
- Belvisi, M. G. (2004). "Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids." Proc Am Thorac Soc **1**(3): 207-214.
- Benitez, H. H., V. M. Arvizu, D. J. Gutierrez, G. A. Fogelbach, A. Castellanos Olivares, F. Vazquez Nava, H. C. Velazquez, C. Gonzalez Perez Mdel, A. Mora Nieto and E. C. Rodriguez (2005). "[Nasal budesonide plus zafirlukast vs nasal budesonide plus loratadine-pseudoephedrine for controlling the symptoms of rhinitis and asthma]." Rev Alerg Mex **52**(2): 90-95.
- Blyth, D. I., M. S. Pedrick, T. J. Savage, E. M. Hessel and D. Fattah (1996). "Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(5): 425-438.
- Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., T. P. Clemmer, G. J. Slotman, C. A. Metz and R. A. Balk (1987). "A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock." N Engl J Med **317**(11): 653-658.
- Brewer, J. M., M. Conacher, C. A. Hunter, M. Mohrs, F. Brombacher and J. Alexander (1999). "Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling." J Immunol **163**(12): 6448-6454.
- Busse, W. W. and R. F. Lemanske, Jr. (2001). "Asthma." N Engl J Med **344**(5): 350-362.
- Campbell, E., C. Hogaboam, P. Lincoln and N. W. Lukacs (1999). "Stem cell factor-induced airway hyperreactivity in allergic and normal mice." Am J Pathol **154**(4): 1259-1265.
- Casale, T. B., D. Wood, H. B. Richerson, S. Trapp, W. J. Metzger, D. Zavala and G. W. Hunninghake (1987). "Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness." J Clin Invest **79**(4): 1197-1203.

- Chibana, K., Y. Ishii, T. Asakura and T. Fukuda (2003). "Up-regulation of cysteinyl leukotriene 1 receptor by IL-13 enables human lung fibroblasts to respond to leukotriene C4 and produce eotaxin." J Immunol **170**(8): 4290-4295.
- Chung, K. F., S. E. Wenzel, J. L. Brozek, A. Bush, M. Castro, P. J. Sterk, I. M. Adcock, E. D. Bateman, E. H. Bel, E. R. Bleeker, L. P. Boulet, C. Brightling, P. Chanaz, S. E. Dahlen, R. Djukanovic, U. Frey, M. Gaga, P. Gibson, Q. Hamid, N. N. Jajour, T. Mauad, R. L. Sorkness and W. G. Teague (2014). "International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma." Eur Respir J **43**(2): 343-373.
- Cicmil, M. G. M. C. J. E. R. M. L. M. A. W. J. W. J. Z.-H. M. (2013). "Alternaria alternata induced inflammatory lung responses: a novel in vivo PK/PD model." J Inflamm (Lond) **10**(Suppl 1): P10.
- Cohn, L. (2006). "Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details." J Clin Invest **116**(2): 306-308.
- Cokugras, H., N. Akcakaya, Seckin, Y. Camcioglu, N. Sarimurat and F. Aksoy (2001). "Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma." Thorax **56**(1): 25-29.
- Cookson, W. (1999). "The alliance of genes and environment in asthma and allergy." Nature **402**(6760 Suppl): B5-11.
- Corren, J., A. G. Harris, D. Aaronson, W. Beaucher, R. Berkowitz, E. Bronsky, R. Chen, P. Chervinsky, R. Cohen, J. Fourre, J. Grossman, E. Meltzer, A. Pedinoff, W. Stricker and A. Wanderer (1997). "Efficacy and safety of loratadine plus pseudoephedrine in patients with seasonal allergic rhinitis and mild asthma." J Allergy Clin Immunol **100**(6 Pt 1): 781-788.
- Cosio, M. G., J. Majo and M. G. Cosio (2002). "Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells." Chest **121**(5 Suppl): 160S-165S.
- Criado, P. R., R. F. Criado, C. W. Maruta and C. Machado Filho (2010). "Histamine, histamine receptors and antihistamines: new concepts." An Bras Dermatol **85**(2): 195-210.
- D'Amato, G., C. Vitale, A. Molino, A. Stanziola, A. Sanduzzi, A. Vatrella, M. Mormile, M. Lanza, G. Calabrese, L. Antonicelli and M. D'Amato (2016). "Asthma-related deaths." Multidiscip Respir Med **11**: 37.
- Da Silva, C. A., L. Reber and N. Frossard (2006). "Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma." Fundam Clin Pharmacol **20**(1): 21-39.
- Davies, H. R., L. Richeldi and E. H. Walters (2003). "Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis." Cochrane Database Syst Rev(3): CD003134.
- Diaz, J., L. Warren, L. Helfner, X. Xue, P. K. Chatterjee, M. Gupta, M. H. Solanki, M. Esposito, V. Bonagura and C. N. Metz (2015). "Obesity shifts house dust mite-induced airway cellular infiltration

- from eosinophils to macrophages: effects of glucocorticoid treatment." Immunol Res **63**(1-3): 197-208.
- Dik, W. A., R. J. McAnulty, M. A. Versnel, B. A. Naber, L. J. Zimmermann, G. J. Laurent and S. E. Mutsaers (2003). "Short course dexamethasone treatment following injury inhibits bleomycin induced fibrosis in rats." Thorax **58**(9): 765-771.
- Dunford, P. J. and S. T. Holgate (2010). "The role of histamine in asthma." Adv Exp Med Biol **709**: 53-66.
- Dunford, P. J., N. O'Donnell, J. P. Riley, K. N. Williams, L. Karlsson and R. L. Thurmond (2006). "The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells." J Immunol **176**(11): 7062-7070.
- Ebina, M., T. Takahashi, T. Chiba and M. Motomiya (1993). "Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscles underlying bronchial asthma. A 3-D morphometric study." Am Rev Respir Dis **148**(3): 720-726.
- Fahy, J. V. and B. F. Dickey (2010). "Airway mucus function and dysfunction." N Engl J Med **363**(23): 2233-2247.
- Falcai, A., P. V. Soeiro-Pereira, C. A. Kubo, C. S. Aranda, D. Sole and A. Condino-Neto (2015). "Peripheral blood mononuclear cells from severe asthmatic children release lower amounts of IL-12 and IL-4 after LPS stimulation." Allergol Immunopathol (Madr) **43**(5): 482-486.
- Fireman, P., D. Skoner, E. Tanner and W. Doyle (1987). "A primate model for the evaluation of antihistamines." Ann Allergy **59**(6 Pt 2): 9-12.
- Galli, S. J., J. R. Gordon and B. K. Wershil (1991). "Cytokine production by mast cells and basophils." Curr Opin Immunol **3**(6): 865-872.
- Gelfand, E. W. (2002). "Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists." Am J Med **113 Suppl 9A**: 2S-7S.
- Gomes, A. C., J. E. Filho and S. H. de Oliveira (2008). "MTA-induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, MIP-2, and LTB4." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **106**(3): 450-456.
- Gonzalez-Avila, G., B. Bazan-Perkins, C. Sandoval, B. Sommer, S. Vadillo-Gonzalez, C. Ramos and A. Aquino-Galvez (2016). "Interstitial collagen turnover during airway remodeling in acute and chronic experimental asthma." Exp Ther Med **12**(3): 1419-1427.
- Gourgoulis, K., Z. Iliodromitis, A. Hatziefthimiou and P. A. Molyvdas (1998). "Epithelium-dependent regulation of airways smooth muscle function. A histamine-nitric oxide pathway." Mediators Inflamm **7**(6): 409-411.

- Gutzmer, R., C. Diestel, S. Mommert, B. Kother, H. Stark, M. Wittmann and T. Werfel (2005). "Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **174**(9): 5224-5232.
- Hartl, D., S. Krauss-Etschmann, B. Koller, P. L. Hordijk, T. W. Kuijpers, F. Hoffmann, A. Hector, E. Eber, V. Marcos, I. Bittmann, O. Eickelberg, M. Griese and D. Roos (2008). "Infiltrated neutrophils acquire novel chemokine receptor expression and chemokine responsiveness in chronic inflammatory lung diseases." J Immunol **181**(11): 8053-8067.
- Heinrich, M. C., D. C. Dooley, A. C. Freed, L. Band, M. E. Hoatlin, W. W. Keeble, S. T. Peters, K. V. Silvey, F. S. Ey, D. Kabat and et al. (1993). "Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells." Blood **82**(3): 771-783.
- Henderson, W. R., Jr., E. Y. Chi, J. L. Teo, C. Nguyen and M. Kahn (2002). "A small molecule inhibitor of redox-regulated NF-kappa B and activator protein-1 transcription blocks allergic airway inflammation in a mouse asthma model." J Immunol **169**(9): 5294-5299.
- Huang, B., D. X. Wang and W. Deng (2014). "Protective effects of dexamethasone on early acute lung injury induced by oleic acid in rats." Int J Clin Exp Med **7**(12): 4698-4709.
- Hulbert, W. M., T. McLean and J. C. Hogg (1985). "The effect of acute airway inflammation on bronchial reactivity in guinea pigs." Am Rev Respir Dis **132**(1): 7-11.
- Jacques, C. A., B. W. Spur, M. Johnson and T. H. Lee (1991). "The mechanism of LTE4-induced histamine hyperresponsiveness in guinea-pig tracheal and human bronchial smooth muscle, in vitro." Br J Pharmacol **104**(4): 859-866.
- Jaffuel, D., M. Mathieu, P. Godard, F. B. Michel and P. Demoly (1999). "[Mechanism of action of glucocorticoids in asthma]." Rev Mal Respir **16**(4): 431-442.
- Jensen-Jarolim, E. and A. Fiocchi (2017). "World Allergy Organization Journal: the Editors Look Back at 2016." World Allergy Organ J **10**(1): 9.
- Johnson, J. R., R. E. Wiley, R. Fattouh, F. K. Swirski, B. U. Gajewska, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, R. Ellis, M. D. Inman and M. Jordana (2004). "Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling." Am J Respir Crit Care Med **169**(3): 378-385.
- Jutel, M., K. Blaser and C. A. Akdis (2005). "Histamine in chronic allergic responses." J Investig Allergol Clin Immunol **15**(1): 1-8.
- Kai, H., K. Yoshitake, A. Hisatsune, T. Kido, Y. Isohama, K. Takahama and T. Miyata (1996). "Dexamethasone suppresses mucus production and MUC-2 and MUC-5AC gene expression by NCI-H292 cells." Am J Physiol **271**(3 Pt 1): L484-488.

- Kaneta, S., H. Yanaguimoto, J. Kagaya, S. Ishizuki and E. Fujihira (1993). "Effects of H₂-antihistamines in murine models of immediate hypersensitivity and chronic inflammation." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **79**(2): 167-184.
- Kassel, O., F. Schmidlin, C. Duvernelle, F. de Blay and N. Frossard (1998). "Up- and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor stem cell factor by human lung fibroblasts in culture." Mol Pharmacol **54**(6): 1073-1079.
- Kassel, O., F. Schmidlin, C. Duvernelle, B. Gasser, G. Massard and N. Frossard (1999). "Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor." Eur Respir J **13**(5): 951-954.
- Kitamura, Y., Y. Kanakura, J. Fujita and T. Nakano (1987). "Differentiation and transdifferentiation of mast cells; a unique member of the hematopoietic cell family." Int J Cell Cloning **5**(2): 108-121.
- Knight, D. A., G. A. Stewart and P. J. Thompson (1992). "Histamine tachyphylaxis in human airway smooth muscle. The role of H₂-receptors and the bronchial epithelium." Am Rev Respir Dis **146**(1): 137-140.
- Kondo, M., J. Nakata, N. Arai, T. Izumo, E. Tagaya, K. Takeyama, J. Tamaoki and A. Nagai (2012). "Niflumic acid inhibits goblet cell degranulation in a guinea pig asthma model." Allergol Int **61**(1): 133-142.
- Kondo, M., J. Tamaoki, K. Takeyama, J. Nakata and A. Nagai (2002). "Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(5): 536-541.
- Kreutner, W., R. W. Chapman, A. Gulbenkian and M. I. Siegel (1987). "Antiallergic activity of loratadine, a non-sedating antihistamine." Allergy **42**(1): 57-63.
- Kumar, R. K. (2001). "Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy?" Pharmacol Ther **91**(2): 93-104.
- Kumar, R. K., C. Herbert and P. S. Foster (2008). "The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice." Curr Drug Targets **9**(6): 485-494.
- Lamblin, C., P. Gosset, I. Tillie-Leblond, F. Saulnier, C. H. Marquette, B. Wallaert and A. B. Tonnel (1998). "Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus." Am J Respir Crit Care Med **157**(2): 394-402.
- Ling, P., K. Ngo, S. Nguyen, R. L. Thurmond, J. P. Edwards, L. Karlsson and W. P. Fung-Leung (2004). "Histamine H₄ receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation." Br J Pharmacol **142**(1): 161-171.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lloyd, C. (2002). "Chemokines in allergic lung inflammation." Immunology **105**(2): 144-154.

- Lloyd, C. M. and E. M. Hessel (2010). "Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells." Nat Rev Immunol **10**(12): 838-848.
- Lu, W., E. P. Lillehoj and K. C. Kim (2005). "Effects of dexamethasone on Muc5ac mucin production by primary airway goblet cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(1): L52-60.
- MacGlashan, D., Jr. (2003). "Histamine: A mediator of inflammation." J Allergy Clin Immunol **112**(4 Suppl): S53-59.
- Melton, L. (2002). "Does mucus hypersecretion matter in airway disease?" Lancet **359**(9321): 1924.
- Metz, M. and M. Maurer (2007). "Mast cells--key effector cells in immune responses." Trends Immunol **28**(5): 234-241.
- Meyts, I., P. W. Hellings, G. Hens, B. M. Vanaudenaerde, B. Verbinnen, H. Heremans, P. Matthys, D. M. Bullens, L. Overbergh, C. Mathieu, K. De Boeck and J. L. Ceuppens (2006). "IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma." J Immunol **177**(9): 6460-6470.
- Nakanishi, A., S. Morita, H. Iwashita, Y. Sagiya, Y. Ashida, H. Shirafuji, Y. Fujisawa, O. Nishimura and M. Fujino (2001). "Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5175-5180.
- Nials, A. T. and S. Uddin (2008). "Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge." Dis Model Mech **1**(4-5): 213-220.
- O'Reilly, M., R. Alpert, S. Jenkinson, R. P. Gladue, S. Foo, S. Trim, B. Peter, M. Trevethick and M. Fidock (2002). "Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis." J Recept Signal Transduct Res **22**(1-4): 431-448.
- Oliveira, L. C., T. M. Danilucci, A. H. Chaves-Neto, A. P. Campanelli, T. C. Silva and S. H. Oliveira (2016). "Tracheal Smooth Muscle Cells Stimulated by Stem Cell Factor-c-Kit Coordinate the Production of Transforming Growth Factor-beta1 and Fibroblast Growth Factor-2 Mediated by Chemokine (C-C Motif) Ligand 3." J Interferon Cytokine Res **36**(6): 401-411.
- Ono, S. J., T. Nakamura, D. Miyazaki, M. Ohbayashi, M. Dawson and M. Toda (2003). "Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function." J Allergy Clin Immunol **111**(6): 1185-1199; quiz 1200.
- Ordonez, C. L., R. Khashayar, H. H. Wong, R. Ferrando, R. Wu, D. M. Hyde, J. A. Hotchkiss, Y. Zhang, A. Novikov, G. Dolganov and J. V. Fahy (2001). "Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression." Am J Respir Crit Care Med **163**(2): 517-523.
- Palomino, D. C. and L. C. Marti (2015). "Chemokines and immunity." Einstein (Sao Paulo) **13**(3): 469-473.

- Piyadasa, H., A. Altieri, S. Basu, J. Schwartz, A. J. Halayko and N. Mookherjee (2016). "Biosignature for airway inflammation in a house dust mite-challenged murine model of allergic asthma." Biol Open **5**(2): 112-121.
- Rafferty, P., L. Jackson, R. Smith and S. T. Holgate (1990). "Terfenadine, a potent histamine H1-receptor antagonist in the treatment of grass pollen sensitive asthma." Br J Clin Pharmacol **30**(2): 229-235.
- Ramos, C. D., C. Canetti, J. T. Souto, J. S. Silva, C. M. Hogaboam, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2005). "MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4." J Leukoc Biol **78**(1): 167-177.
- Reader, J. R., D. M. Hyde, E. S. Schelegle, M. C. Aldrich, A. M. Stoddard, M. P. McLane, R. C. Levitt and J. S. Tepper (2003). "Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(6): 664-672.
- Rogers, D. F. (2003). "The airway goblet cell." Int J Biochem Cell Biol **35**(1): 1-6.
- Sabroe, I., A. Hartnell, L. A. Jopling, S. Bel, P. D. Ponath, J. E. Pease, P. D. Collins and T. J. Williams (1999). "Differential regulation of eosinophil chemokine signaling via CCR3 and non-CCR3 pathways." J Immunol **162**(5): 2946-2955.
- Sarpong, S. B., L. Y. Zhang and S. R. Kleeberger (2003). "A novel mouse model of experimental asthma." Int Arch Allergy Immunol **132**(4): 346-354.
- Takami, S., T. Mizuno, T. Oyanagi, H. Tadaki, T. Suzuki, K. Muramatsu, T. Takizawa and H. Arakawa (2012). "Glucocorticoids inhibit MUC5AC production induced by transforming growth factor-alpha in human respiratory cells." Allergol Int **61**(3): 451-459.
- Takeshita, K., K. Sakai, K. B. Bacon and F. Gantner (2003). "Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo." J Pharmacol Exp Ther **307**(3): 1072-1078.
- Tamaoki, J., J. Nakata, K. Takeyama, A. Chiyotani and K. Konno (1997). "Histamine H2 receptor-mediated airway goblet cell secretion and its modulation by histamine-degrading enzymes." J Allergy Clin Immunol **99**(2): 233-238.
- Teixeira, M. M., T. N. Wells, N. W. Lukacs, A. E. Proudfoot, S. L. Kunkel, T. J. Williams and P. G. Hellewell (1997). "Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin." J Clin Invest **100**(7): 1657-1666.
- Temann, U. A., B. Prasad, M. W. Gallup, C. Basbaum, S. B. Ho, R. A. Flavell and J. A. Rankin (1997). "A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion." Am J Respir Cell Mol Biol **16**(4): 471-478.

- Temelkovski, J., S. P. Hogan, D. P. Shepherd, P. S. Foster and R. K. Kumar (1998). "An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen." Thorax **53**(10): 849-856.
- Teng, Z., Y. Wang, F. Li, H. Yan and Z. Liu (2008). "Tracheal compliance and limit flow rate changes in a murine model of asthma." Sci China C Life Sci **51**(10): 922-931.
- Thai, P., Y. Chen, G. Dolganov and R. Wu (2005). "Differential regulation of MUC5AC/Muc5ac and hCLCA-1/mGob-5 expression in airway epithelium." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(6): 523-530.
- Thomson, A. W. (1998). The cytokine handbook. San Diego, Academic Press.
- Thurmond, R. L., P. J. Desai, P. J. Dunford, W. P. Fung-Leung, C. L. Hofstra, W. Jiang, S. Nguyen, J. P. Riley, S. Sun, K. N. Williams, J. P. Edwards and L. Karlsson (2004). "A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties." J Pharmacol Exp Ther **309**(1): 404-413.
- Toda, M., M. K. Tulic, R. C. Levitt and Q. Hamid (2002). "A calcium-activated chloride channel (HCLCA1) is strongly related to IL-9 expression and mucus production in bronchial epithelium of patients with asthma." J Allergy Clin Immunol **109**(2): 246-250.
- Town, G. I. and S. T. Holgate (1990). "Comparison of the effect of loratadine on the airway and skin responses to histamine, methacholine, and allergen in subjects with asthma." J Allergy Clin Immunol **86**(6 Pt 1): 886-893.
- Varga, C., K. Horvath, A. Berko, R. L. Thurmond, P. J. Dunford and B. J. Whittle (2005). "Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat." Eur J Pharmacol **522**(1-3): 130-138.
- Vignola, A. M., P. Chanez, A. M. Campbell, F. Souques, B. Lebel, I. Enander and J. Bousquet (1998). "Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma." Am J Respir Crit Care Med **157**(2): 403-409.
- Wedemeyer, J., M. Tsai and S. J. Galli (2000). "Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity." Curr Opin Immunol **12**(6): 624-631.
- Weibel, E. R. (1963). "Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs." Lab Invest **12**: 131-155.
- Wells, U. M., Z. Hanafi and J. G. Widdicombe (1996). "Tracheal epithelial damage alters the effects of luminal histamine on blood flow and tracer flux in anaesthetized sheep." Eur Respir J **9**(1): 78-85.
- White, M. V. (1990). "The role of histamine in allergic diseases." J Allergy Clin Immunol **86**(4 Pt 2): 599-605.

