

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise fisiológica dos efeitos de um bacteriófago em fusão com um peptídeo inibidor  
de PLA2 (F7-PLI) em modelo experimental murino de asma alérgica

Líris Marini Dias Coelho

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Instituto de Biotecnologia

Uberlândia - MG

Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Análise fisiológica dos efeitos de um bacteriófago em fusão com um peptídeo inibidor de PLA2 (F7-PLI) em modelo experimental murino de asma alérgica

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Julho – 2018

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família,*

*que tanto me apoiou em*

*minha formação profissional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por estar sempre presente, ter permitido esta oportunidade em minha vida e por ter me dado saúde e força de superação.

Aos meus pais, Silvio e Glauciana e meu irmão Douglas, pelo apoio, paciência e incentivo, sem eles nada disso seria possível.

Aos professores que contribuíram com o ensino e aprendizado nesta trajetória, permitindo um crescimento profissional e uma visão pessoal mais abrangente. Em especial ao meu orientador Luiz Ricardo pela confiança, pela oportunidade e dedicação para desenvolver este trabalho.

Ao pessoal do grupo de pesquisa em Fisiologia Integrativa e do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial a Léia, Fabiana e Patrícia, por muitas vezes terem dedicado parte de seu tempo na orientação e desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Robinson Sabino da Silva, do Laboratório de Fisiologia Integrativa e Nanobiotecnologia, pela contribuição imprescindível na elaboração do modelo experimental.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias, dificuldades e de conquistas.

A todos que diretamente e indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO

A asma alérgica é uma doença inflamatória de alta prevalência, caracterizada por obstruir as vias aéreas e que pode ser identificada por sintomas variáveis e recorrentes como: limitação do fluxo de ar, tosse, dispneia e cansaço. Estudos clínicos demonstraram que, com o progresso da doença, a inflamação recorrente das vias aéreas pode levar a repetidos ataques (crises de exacerbação), bronco constrição e hiper-reatividade brônquica. Essa inflamação pode ser atribuída aos elevados níveis de lisofosfatidilcolina (LPC) nos pulmões que, em indivíduos asmáticos e modelos animais de asma, aumenta os níveis de enzimas fosfolipase A2 (PLA2), que tem grande importância no remodelamento das vias respiratórias. Observou-se que a ativação da família PLA2 é um processo chave para a produção de precursores na biossíntese de mediadores inflamatórios e quando inibida, oferece uma atrativa abordagem terapêutica no desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da asma. Diante desses fatos, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos fisiológicos de um fago expressando peptídeo mimético ao inibidor de PLA2 (F7-PLI) em um modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina em camundongos *Swiss webster*. Foram utilizados 7 tratamentos diferentes (n=7 por grupo), contendo animais não asmáticos tratados com salina (SAL) e animais asmáticos (OVA) tratados com Dexametasona, fago expressando um peptídeo mimético ao inibidor de PLA2 e fago selvagem, respectivamente. A asma foi induzida através da sensibilização dos animais por Ovalbumina e Hidróxido de Alumínio – AL (OH)<sub>3</sub> que, em seguida, receberam um desafio antigênico. Após 48h do último desafio, foram analisados os parâmetros eletrofisiológicos respiratórios dos camundongos e coletado o lavado broncoalveolar (BAL) para análise dos metabólitos no FTIR. Os resultados foram expressos em média ± EPM e comparados por análise de variância ANOVA. O volume corrente e volume minuto apresentaram-se elevados nos animais asmáticos tratados com o fago (F7PLI) em comparação aos animais saudáveis (SAL). Assim, pode-se concluir que a inibição da enzima PLA2 em camundongos sensibilizados com ovalbumina e tratados com peptídeo mimético inibidor de PLA2 pode melhorar a função respiratória destes animais, como consequente diminuição da inflamação das vias aéreas.

**Palavras-chave:** Asma; Inflamação; Fosfolipase A2; Ovalbumina.

## **ABSTRACT**

Allergic asthma is an inflammatory disease of high prevalence, characterized by obstructing the airways and can be identified by variable and recurrent symptoms such as: airflow limitation, cough, dyspnea and tiredness. Clinical studies have shown that, as the disease progresses, recurrent airway inflammation can lead to repeated attacks (exacerbations), bronchoconstriction, and bronchial hyperreactivity. This inflammation can be attributed to elevated levels of lysophosphatidylcholine (LPC) in the lungs, which in asthmatic individuals and animal models of asthma increases the levels of phospholipase A2 (PLA2) enzymes, which is of great importance in airway remodeling. It was observed that the activation of the PLA2 family is a key process for the production of precursors in the biosynthesis of inflammatory mediators and when inhibited, offers an attractive therapeutic approach in the development of new agents for the treatment of asthma. In view of these facts, the objective of this work was to analyze the physiological effects of a PLA2 inhibitor phage (F7-PLI) in an experimental model of ovalbumin-induced allergic asthma in Swiss webster mice. Seven different treatments (n = 7 per group) were used, containing non-asthmatic animals treated with saline (SAL) and asthmatic animals (OVA) treated with Dexamethasone, phage expressing a peptide mimetic inhibitor of PLA2 and wild phage, respectively. Asthma was induced by sensitizing the animals to Ovalbumin and Aluminum Hydroxide - AL (OH) 3 which then received an antigen challenge. After 48h of the last challenge, the respiratory electrophysiological parameters of the mice were analyzed and the bronchoalveolar lavage (BAL) was collected to analyze the metabolites in the FTIR. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and compared by analysis of variance ANOVA. The current volume and minute volume were higher in asthmatic animals treated with F7PLI phage compared to healthy animals (SAL). Thus, it can be concluded that the inhibition of the PLA2 enzyme in mice sensitized with ovalbumin and treated with peptide inhibitor PLA2 mimetic can improve the respiratory function of these animals, as a consequence of the reduction of inflammation of the airways.

**Keywords:** Asthma; Inflammation; Phospholipase A2; Ovalbumin.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Corte transversal de um brônquio

Figura 2. Prevalência mundial de asma clínica.

Figura 3. Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina.

Figura 4. Avaliação do volume corrente

Figura 5. Avaliação da frequência respiratória

Figura 6. Avaliação do volume minuto (Volume Corrente x Frequência).

Figura 7. Avaliação do volume corrente (A), Frequência (B) e Volume Minuto (Volume Corrente x Frequência) (C).

Figura 8. Análise da área das bandas obtidas pelo FTIR do BAL

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação da severidade da asma

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>Al(OH)<sub>3</sub></b>	Hidroxido de alumínio
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ARFIS</b>	Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais
<b>BAL</b>	Lavado broncoalveolar
<b>CEUA</b>	Comitê de tica no Uso de Animais
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DEXA</b>	Dexametasona
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>F7-PLI</b>	Fago expressando peptídeo mimético ao inibidor de PLA2
<b>FEV1</b>	Volume expiratório máximo no primeiro segundo
<b>FTIR</b>	Espectrmetro de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i>
<b>FVC</b>	Capacidade vital de expiração forçada
<b>GINA</b>	Global Initiative for Asthma
<b>i.n.</b>	Via intranasal
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>IBTEC</b>	Instituto de Biotecnologia
<b>ICBIM</b>	Instituto de Ciências Biomédicas
<b>LPC</b>	Lisofosfatidilcolina
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Saline Buffer</i>
<b>PLA2</b>	Fosfolipase A2
<b>PLIs</b>	Proteínas inibidoras de PLA2
<b>rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>s.c.</b>	Administração subcutânea
<b>SAL</b>	Salina
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia
<b><math>\gamma</math>PLIs</b>	Inibidores da classe $\gamma$

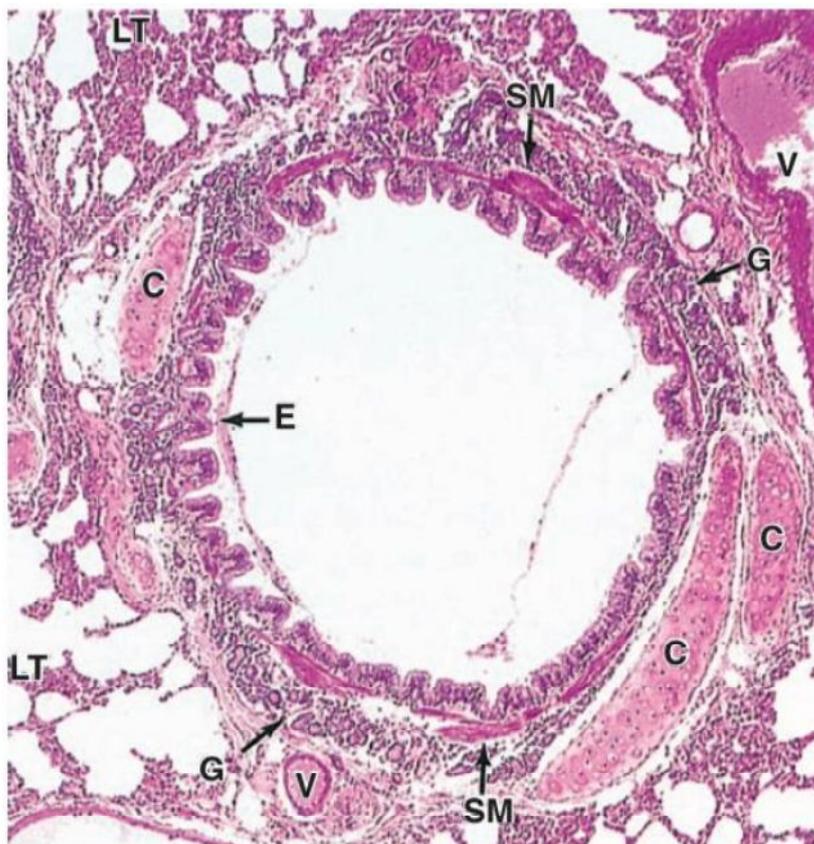
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 Objetivos .....	16
1.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
2.1 Aspectos éticos .....	16
2.2 Local de Estudo .....	16
2.3 Caracterização e Tamanho da Amostra .....	17
2.4 Animais.....	18
2.5 Metodologia .....	18
2.5.1 Obtenção do peptídeo mimético inibidor e peptídeo irrelevante .....	18
2.5.2 Obtenção do fago selvagem .....	19
2.5.3 Modelo experimental de asma alérgica .....	20
2.5.4 Avaliação dos Parâmetros Eletrofisiológicos .....	21
2.5.5 Obtenção do lavado broncoalveolar .....	21
2.5.6 Coleta de tecido pulmonar .....	21
2.5.7 Determinação de biomarcadores pulmonares por meio de FTIR.....	22
2.5.8 Análise estatística .....	22
<b>3. RESULTADOS</b> .....	22
3.1 Avaliações Parâmetros Eletrofisiológicos Respiratórios .....	22
3.2 Análises Complementares dos Parâmetros Eletrofisiológicos Respiratórios .....	24
3.3 Determinação de biomarcadores pulmonares por meio de FTIR .....	25
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

## 1 – INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias respiratórias, que pode ser caracterizada por lesão epitelial, hiper-reatividade e obstrução das vias aéreas (GINA, 2018). O estreitamento dessas vias pode ocasionar sintomas como produção excessiva de muco, tosse, dispneia, cansaço, ansiedade, taquicardia e aumento da pressão torácica (AKINBAMI *et al.*, 2012). O epitélio das vias aéreas é composto por muitos componentes estruturais (Figura 1) e células inflamatórias, sendo que o número, a ativação e o componente secretor dessas células apresentam-se alterados na doença, como o elevado número de eosinófilos e linfócitos T na camada subepitelial (JACOBESSEN *et al.*, 2014).

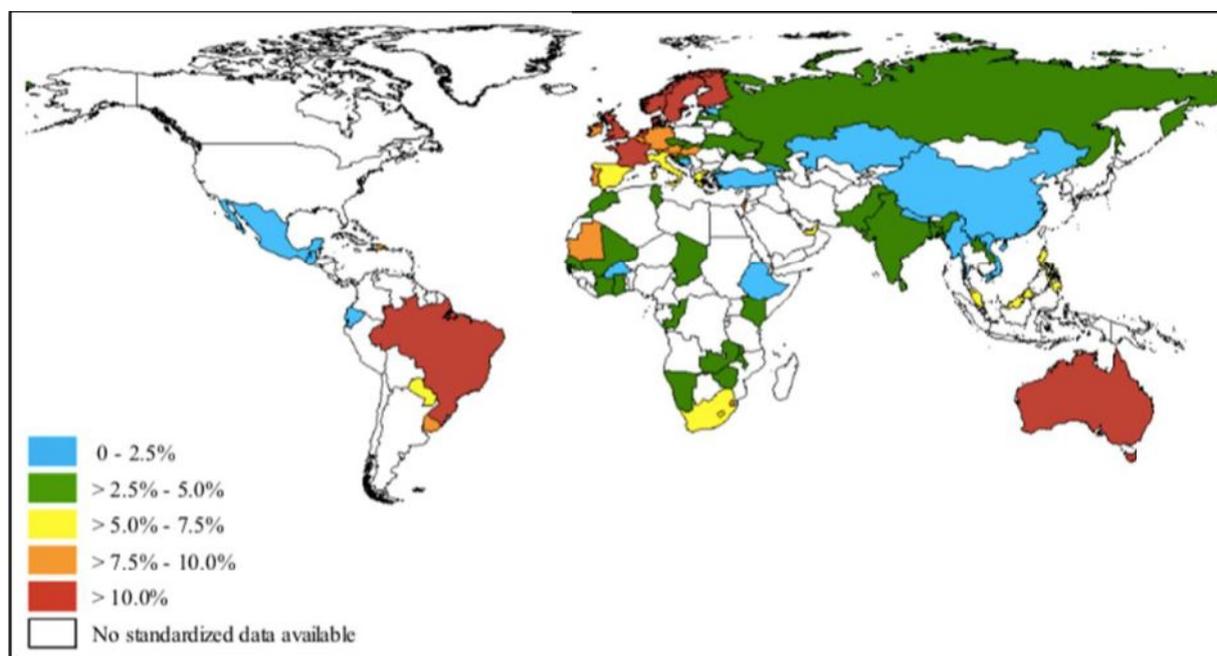
**Figura 1.** Corte transversal de um brônquio. O revestimento do epitélio respiratório (E) e a mucosa são dobrados devido à contração de seu músculo liso (SM). Na árvore brônquica, a parede também é circundada por pedaços de cartilagem hialina (C) e contém glândulas seromucosas (G) na submucosa que drenam para o lúmen. No tecido conjuntivo ao redor dos brônquios podem ser vistas artérias e veias (V), que também se ramificam como vasos menores na abordagem dos bronquíolos respiratórios. Todos os brônquios são circundados por tecido pulmonar distinto (LT), mostrando os muitos espaços vazios dos alvéolos pulmonares.



Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO (2017)

Esta doença é considerada como um problema de grande impacto na saúde pública mundial, pois atinge cerca de 300 milhões de pessoas no mundo e aproximadamente 50% dessas vivem em países em desenvolvimento com acesso limitado a remédios (PAWANKAR *et al.*, 2011). Além disso, a prevalência da asma na população varia de acordo com o país de ocorrência, como pode ser observado na Figura 2, variando de 0,2% na China e 21% na Austrália (TO *et al.*, 2012). No Brasil, dados do Ministério da Saúde (2015) indicam que 6,4 milhões de brasileiros sofrem com a doença, que leva a cerca de 105 mil internações hospitalares.

**Figura 2.** Prevalência mundial de asma clínica.



Fonte: TO *et al.*, 2012.

A limitação no fluxo aéreo expiratório é uma característica que pode ser utilizada na classificação de severidade da asma em leve, moderada ou grave; e para isso, utiliza-se a espirometria, técnica de avaliação funcional pulmonar, pela qual é possível analisar a obstrução do fluxo aéreo e estimar a responsividade brônquica a tratamentos (GINA, 2016). Dessa forma, a doença é classificada na Tabela 1, de acordo com as análises clínicas da frequência dos sintomas, do volume expiratório máximo no primeiro segundo (FEV<sub>1</sub>) e da capacidade vital de expiração forçada (FVC) (SULAIMAN ALHASSAM *et al.*, 2016).

**Tabela 1.** Classificação da severidade da asma.

Componentes de Severidade	Asma Intermitente	Asma Persistente		
		Leve	Moderada	Severa
<b>Sintomas de Comprometimento</b>	≤2 dias/semana	>2dias/semana	Diários	Diários e contínuos
<b>Despertares noturnos</b>	≤2x/mês	3-4/ mês	>1/semana	Frequente (7x/semana)
<b>Uso de medicamento para controle dos sintomas</b>	≤2dias/semana	>2 dias/semana	Diário	Várias vezes ao dia
<b>Interferência nas atividades normais</b>	Nenhuma	Pouca limitação	Alguma limitação	Extremamente limitado
<b>Função pulmonar (entre exacerbações)</b>	FEV <sub>1</sub> /FVC Normal	FEV <sub>1</sub> /FVC Normal	FEV <sub>1</sub> /FVC reduzido 5%	FEV <sub>1</sub> /FVC reduzido > 5%
	FEV <sub>1</sub> >80%	FEV <sub>1</sub> >80%	FEV <sub>1</sub> 60-80%	FEV <sub>1</sub> <60%
<b>Risco de exacerbação</b>	0-1/ano	≥2/ano	≥2/ano	≥2/ano

Fonte: Adaptado de SULAIMAN ALHASSAN, M. D. *et al.*, 2016.

A asma pode ser causada por uma combinação de interações genéticas e ambientais, que vão desde a exposição de indivíduos sensibilizados a alérgenos (pólen, poeira, pelos de animais), infecções virais, fumaça ou poluição, prática de exercícios e obesidade (MILLER, 2008). De acordo com o Ministério da Saúde (2015), os sintomas são mais comuns em crianças, apesar de afetar todas as idades.

Os processos inflamatórios característicos dessa doença são respostas fisiológicas do organismo a diferentes estímulos, como infecções ou mecanismos imunológicos e a reação inflamatória pode ser caracterizada pela estimulação de sistemas mediadores humoral e celular e pela liberação de uma grande variedade de mediadores inflamatórios, que resultam em alterações microvasculares e de permeabilidade (ABBAS, 2015).

Estudos clínicos demonstraram que com o progresso da doença, a inflamação recorrente das vias aéreas pode levar a repetidos ataques (crises de exacerbação), bronco constrição e

hiper-reatividade brônquica (LEMANSKE & BUSSE, 2010). Estudos tem aumentado o entendimento sobre a asma e a habilidade de controlá-la de forma eficaz, proporcionando diagnósticos precoces da doença e implementações de terapias e medicamentos apropriados, que reduzem significativamente o impacto socioeconômico desta e melhoram a qualidade de vida do paciente (BATEMAN, 2008).

Por ser uma doença crônica, mas variável, tratamentos específicos para a asma devem ser ajustados de acordo com a severidade apresentada, seja de forma aguda, durante as exacerbações e cronicamente, no contexto da eliminação ou redução dos sintomas (LEMANSKE & BUSSE, 2010). A inalação de corticosteroides, medicamentos anti-inflamatórios, é a principal forma de tratamento na redução dos sintomas da asma persistente, tanto em adultos como em crianças (IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma, 2006).

Segundo Yoder (2014), a inflamação das vias aéreas pode ser atribuída aos elevados níveis de lisofosfatidilcolina (LPC) nos pulmões, um mediador lipídico, que em indivíduos asmáticos (CHILTON *et al.*, 1996; HALLSTRAND *et al.*, 2007; TRIGGIANI *et al.*, 2009) e modelos animais de asma (SANE *et al.*, 1996; CHUNG *et al.*, 2004) aumenta os níveis de enzimas fosfolipase A2 (PLA2) presentes.

Existem diversos protocolos de sensibilização de animais, sendo mais utilizado o modelo murinho, através da sensibilização com ovalbumina (OVA) e hidróxido de alumínio ( $Al(OH)_3$ ) pela via intraperitoneal (i.p.), com intervalo de 14 dias. O desafio com OVA foi feito após 7 dias, pela via intranasal (i.n.) para instilação, durante 3 dias consecutivos para os modelos agudos (CONRAD *et al.*, 2009). Os modelos murinos de asma desencadeiam uma importante resposta alérgica Th2 e tem sido úteis para um melhor entendimento de processos de mecanismo de doença alérgica e testes pré-clínicos de novos fármacos, sendo os parâmetros fisiológicos revertidos após a melhora da doença pelo tratamento com fago expressando um peptídeo mimético inibidor de PLA2 (MRUWAT *et al.*, 2013).

A ativação da família PLA2 é um processo chave para a produção de precursores na biossíntese de mediadores inflamatórios lipídicos e a inibição dessa enzima pode resultar na supressão de três classes importantes de lipídios inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação de plaquetas), os quais oferecem uma atrativa abordagem terapêutica no desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de inflamações e lesões teciduais (HELLER *et al.*, 1998). Proteínas inibidoras de PLA2 podem ser obtidas do plasma de serpentes peçonhentas e não-peçonhentas, denominadas PLIs (FORTES-DIAS, 2002; QUIRÓS *et al.*, 2007). Especificamente, as PLIs catalisam a hidrólise da ponte de éster de fosfolipídios e geram ácidos graxos e lisofosfolipídicos, que ao serem liberados, agem como mensageiros secundários

e precursores de eicosanoides, potenciais mediadores de inflamação (DENNIS, 1997; BURKE & DENNIS, 2009).

De acordo com os aspectos estruturais, os inibidores de PLA2 podem ser classificados em três classes:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (INOUE *et al.*, 1991; THWIN *et al.*, 2002). Os inibidores da classe  $\gamma$  ( $\gamma$ PLIs) são glicoproteínas ácidas com peso molecular entre 90 e 130 kDa (FORTES-DIAS *et al.*, 1994; OHKURA *et al.*, 1994; PERALES *et al.*, 1995). Essas glicoproteínas demonstraram grande potencial inibidor contra diferentes classes de PLA2, por sua capacidade de reconhecer a dobra de ligação de cálcio nessas enzimas (DUNM & BROADY, 2001). Os inibidores tipo  $\gamma$  possuem uma região comum que reconhecem PLA2 e conseqüentemente, são capazes de inibir suas atividades. Uma região parcialmente similar foi encontrada na sequência primária da proteína  $\gamma$ CdcPLI (GIMENEZ *et al.*, 2014), e a partir dessa, o fago F7-PLI, contendo um peptídeo recombinante mimético ao inibidor de PLA2 foi selecionado através da tecnologia de *phage display*. O inibidor recém-relatado e seu uso são reivindicados sob o pedido de patente BR1020160309468, 29 de dezembro de 2016, com autoria de GIMENEZ *et al.* (2014).

Peptídeos selecionados por meio dessa técnica possuem similaridades físico-químicas que permitem sua utilização como mimetópos, que são peptídeos diferentes de seu ligante natural, mas capazes de mimetizar o epítipo natural, os quais tem as mesmas propriedades imunogênicas que seu determinante e assim, certa sensibilidade e especificidade a determinados alvos, o que permite sua aplicação em métodos diagnósticos e terapêuticos (VODINIK *et al.*, 2011; ALMEIDA, 2015). A seleção dos peptídeos de interesse é feita em uma biblioteca de apresentação em fagos, uma mistura complexa de clones de fagos que exibem peptídeos aleatórios, proteínas estranhas ou domínios de proteínas geneticamente fundidos com proteínas da superfície do fago (SMITH & PETRENKO, 1997). Os fagos filamentosos com peptídeos exibidos fundidos ao terminal N das proteínas da superfície de p3 ou p8 são tipicamente utilizados (BRATKOVIC, 2010). Assim, bibliotecas de apresentação em fagos comercialmente disponíveis tem como base o fago filamentoso M13 (Ph.D.TM-C7C; *New England Biolabs*) ou fago F7 específico utilizado. De acordo com Vodnik (2011), grandes populações de fagos podem ser rastreadas em um processo chamado *biopanning* para produzir ligantes que exibem o comportamento alvo desejado e os clones destes fagos são incubados com a molécula alvo imobilizada. Os fagos não-ligantes (fagos selvagens) são então removidos por múltiplos passos de lavagem e os fagos ligados ao alvo são recuperados por diferentes estratégias de eluição. Dessa forma, o fago F7PLI pode ser utilizado na observação dos efeitos fisiológicos na via de inibição da enzima PLA2.

Considerando que a inibição da enzima PLA2 é capaz de reduzir reações inflamatórias, que são frequentes em indivíduos asmáticos e que os mecanismos patofisiológicos que desencadeiam esta condição ainda não foram descritos, é essencial o desenvolvimento de modelos experimentais para caracterização da asma, conhecimento dos mecanismos moleculares que provocam as reações inflamatórias e para avaliação da atuação da PLA2 nesse sistema, possibilitando o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença e visando uma melhoria na qualidade de vida de pacientes asmáticos.

### **1.3 - Objetivos**

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de um bacteriófago em fusão ao inibidor de PLA2 (F7-PLI) em modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos.

#### **1.3.1 - Objetivos específicos**

- Instilar o camundongo com um bacteriófago contendo o peptídeo mimético ao inibidor específico conjugado em sua superfície, para verificar o efeito deste como veículo;
- Analisar o perfil proteico e lipídico do lavado broncoalveolar (BAL) por meio de espectroscopia FTIR.

## **2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 - Aspectos éticos**

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) protocolo 144/16. Todo o processo de coleta, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo *et al.* (2005).

### **2.2 - Local do estudo**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), no Laboratório de Fisiologia Geral do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - ARFIS da

Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob orientação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e Co-orientação do Prof. Robinson Sabino da Silva. Os testes foram realizados em camundongos do Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (ARFIS) da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho.

### 2.3 - Caracterização e tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado de acordo com Sampaio (2007) o qual é baseado nos valores médios e desvio padrão dos dados da variável mais instável a ser medida. Portanto, foram utilizados os dados de análise de bronquite em modelos de asma que tiveram modulação da via de fosfolipases do estudo de Shoseyov *et al.* (2005).

FÓRMULA (SAMPAIO, 2007): variação da média =  $t \times sd/\sqrt{n}$

Onde: t (valor tabelado de acordo com Sampaio (2007)); sd (desvio padrão); n (número de animais a ser utilizado).

Intervalo de confiança da média = 30%

Variável	Média	Desvio	IC = 30%
CystLT	23	9,1	6,9

CÁLCULO:

$$6,9 = 2 \times 9,1 / \sqrt{n}$$

$$\sqrt{n} = 18,2 / 6,9$$

$$(\sqrt{n})^2 = (2,64)^2$$

$$n = 7,01$$

Desta forma, para compor a amostra o número de animais foi dividido aleatoriamente em sete grupos experimentais:

Grupo 1) Não asmáticos tratados com salina (SAL): camundongos sensibilizados com veículo e tratados com veículo (salina estéril 0,9%); n=7.

Grupo 2) Asmáticos tratados com salina (OVA): camundongos sensibilizados com ovalbumina e tratados com veículo (salina estéril 0,9%); n=7.

Grupo 3) Asmáticos tratados com Dexametasona (OVA + DEXA): camundongos

sensibilizados com ovalbumina e tratados com dexametasona (DEXA); n=7.

Grupo 4) Não asmáticos tratados com fago expressando peptídeo inibidor de PLA2 (PEP): camundongos sensibilizados com salina e tratados com fago expressando peptídeo mimético inibidor de PLA2 (F7-PLI); n=7.

Grupo 5) Não asmáticos tratados com fago selvagem (SELV): camundongos sensibilizados com salina e tratados somente com fago selvagem (Selv); n=7.

Grupo 6) Asmáticos tratados com fago expressando peptídeo inibidor de PLA2 (OVA + PEP): camundongos sensibilizados com ovalbumina e tratados com fago expressando peptídeo mimético inibidor de PLA2 (F7-PLI); n=7.

Grupo 7) Asmáticos tratados com fago selvagem (OVA + SELV): camundongos sensibilizados com ovalbumina e tratados com fago selvagem (Selv); n=7.

## **2.4 – Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss Webster machos de 8 - 12 semanas de idade, pesando de 20 - 40g, obtidos junto ao Centro de Bioterismo e Experimentação em Animais (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram acondicionados ao biotério nas seguintes condições: a) ciclo claro/ escuro de 12 horas; b) temperatura ambiente  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ; c) oferta plena de água e ração para roedores e d) alojados em gaiolas com no máximo 5 indivíduos.

## **2.5 - Metodologia**

### **2.5.1 – Obtenção do peptídeo mimético inibidor**

A obtenção de bacteriófagos filamentosos (fagos) foi realizada a partir da biblioteca PhDC7C Phage Display Peptide Library (*New England BioLabs*<sup>®</sup>). Os fagos expressando o peptídeo mimético inibidor de PLA2 (F7-PLI), foram amplificados em cultura de *Escherichia coli* ER2738 e, posteriormente, quantificados. Foi preparado o meio LB na proporção de 0,2g de LB para cada 10 mL e o mesmo autoclavado (utilizou-se 60 mL de meio). No fluxo laminar, adicionou-se tetraciclina ao meio LB total autoclavado (1  $\mu\text{L}$  de tetraciclina para cada 1 mL de meio). Em seguida, as bactérias *E. coli* ER2738 foram adicionadas ao meio LB em um erlenmeyer para amplificação dos fagos F7PLI. Incubou-se a  $37^\circ\text{C}$  a 250 rotações por minuto

(rpm) até atingir a D.O.  $\sim 0,3$  em 600 $\gamma$  e em seguida adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de fago de um *backup* e incubou novamente a 37°C, sob agitação de 250 rpm *overnight*.

No dia seguinte, uma centrifugação foi realizada a 11000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga, onde acrescentou-se 1/6 do volume de PEG e incubou novamente *overnight*, a 4°C. No terceiro dia de purificação, o tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi diluído em 1 mL de PBS e transferido para um microtubo de 1,5 mL para nova centrifugação (14000 rpm, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante dessa centrifugação foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL para retirar qualquer resíduo de bactérias e adicionou-se 1/6 de PEG, para incubação por 1h em gelo e posterior centrifugação a 14000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 200  $\mu\text{L}$  de PBS e homogeneizado antes de ser centrifugado a 14000 rpm novamente, durante 1 minuto a 4°C. Finalizada essa etapa, transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo e os fagos foram utilizados na determinação do título pela infecção em *E. coli* ER2738, processo no qual se quantifica os fagos presentes na amostra.

Para a quantificação do fago F7-PLI, 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi diluído em 990  $\mu\text{L}$  de PBS 1x estéril (autoclavado). Selecionou-se a absorbância de 269/320 no espectrofotômetro e foi adicionado 1 mL de PBS 1x (estéril) à cubeta para mensuração do branco (Blank). Após a leitura do blank, a cubeta foi lavada e mensurou-se a amostra de fago (10  $\mu\text{L}$ ). Os resultados obtidos foram colocados na seguinte fórmula e divididos nas doses corretas a serem aplicadas nos animais, que corresponde a  $1 \times 10^{11}$  fagos/ dose (dose/animal = 25 $\mu\text{L}$ ).

$$\text{Fago}/\mu\text{L} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \times 6 \times 10^{11}}{0,7222}$$

### 2.5.2 – Obtenção do fago selvagem

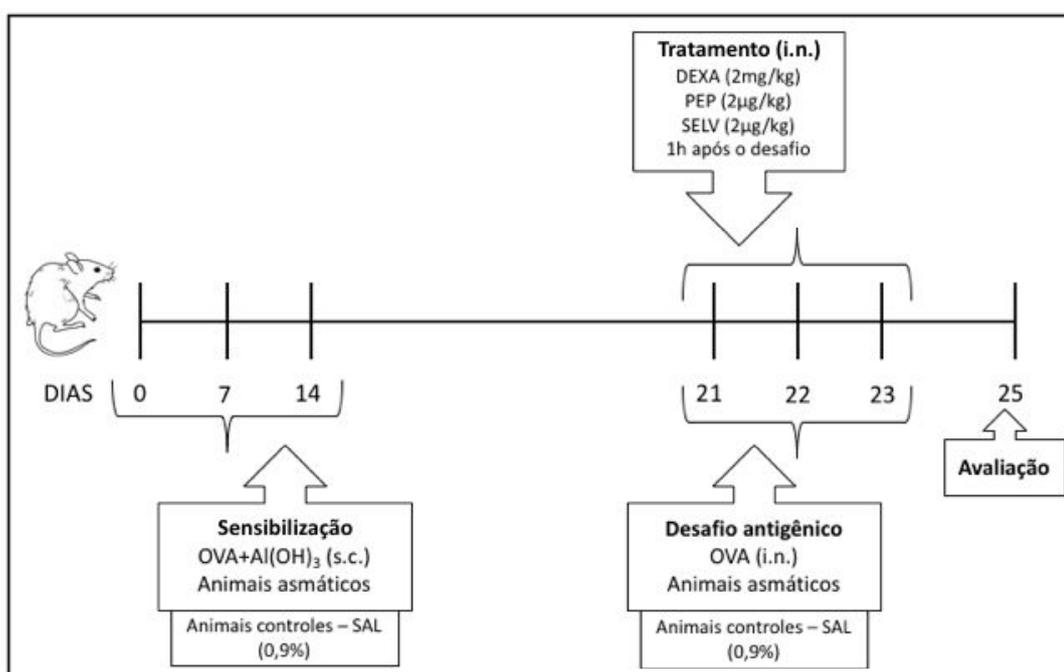
Como controle negativo das reações nos ensaios imunoenzimáticos foi utilizado o fago M13 (*New England BioLabs*<sup>®</sup>). Esse fago é usado como controle ou para titulação dos estoques de fagos por não apresentar peptídeo fusionado na pIII do capsídeo viral. Os procedimentos de amplificação e quantificação do fago selvagem foram os mesmos utilizados para os fagos selecionados expressando o peptídeo mimético inibidor de PLA2 (F7-PLI).

### 2.5.3 - Modelo experimental de asma alérgica

Todos os animais receberam imunização sistêmica por meio de administração subcutânea (s.c.) de ovalbumina (OVA) (50 µg/animal) (*Sigma Chemical*) e hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (5 mg/animal) (Alfa Aesar) diluído em solução salina (estéril 0,9%) com volume final de 200 µl nos dias 0, 7 e 14 do experimento (CONRAD *et al.*, 2009). Nos dias 21, 22 e 23, todos os animais foram anestesiados com uma injeção anestésica intraperitoneal (i.p) de Xilazina (12 mg/kg) (Ceva) e Cetamina (80 mg/kg) (Ceva) para que fossem realizados os desafios antigênicos através da administração intranasal (i.n) de OVA (25 µg/25 µl). Nos animais controles foram inoculados o mesmo volume de solução salina (veículo).

Os animais dos grupos (Grupo 3), (Grupo 4), (Grupo 5), (Grupo 6) e (Grupo 7) receberam tratamento pela via intranasal, por instilação, 60 minutos após cada desafio antigênico com as respectivas doses: Dexametasona (2 mg/kg; i.p) (Farmace), fago expressando peptídeo mimético ao inibidor de PLA2 (F7-PLI) (25µL) e selvagem (25µL).

**Figura 3.** Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina e tratamentos com fago expressando peptídeo mimético inibidor de PLA2 (F7-PLI) e fago selvagem. SAL: salina; OVA: ovalbumina; Al(OH)<sub>3</sub>: hidróxido de alumínio; DEXA: dexametasona; PEP: fago expressando peptídeo mimético inibidor de PLA2 (F7PLI); SELV: fago selvagem; s.c.: subcutânea; i.n.: instilação nasal. Camundongos foram sensibilizados nos dias 0, 7 e 14 com uma injeção subcutânea de OVA combinada com hidróxido de Alumínio. Nos dias 21, 22 e 23, os animais foram desafiados com instilação nasal de OVA e 60 minutos depois, receberam tratamentos via instilação nasal. Quarenta e oito horas após o desafio com OVA (dia 25), os parâmetros eletrofisiológicos foram avaliados.



### **2.5.4 - Avaliação dos Parâmetros Eletrofisiológicos**

Após 48h do último desafio, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p) de xilazina (12 mg/kg) (Ceva) e cetamina (80 mg/kg) (Ceva) e submetidos a análises eletrofisiológicas de parâmetros respiratórios. Para análises desses parâmetros, os animais foram mantidos por 3 minutos em um sistema de ventilação ligado ao sensor de espirômetro para avaliação da função pulmonar. Através desta medição, coletou-se os volumes pulmonares (volume corrente, frequência respiratória e volume minuto), dados essenciais na caracterização do estado fisiopatológico dos pulmões e estes foram descritos em volts, convertidos em mililitros (10 v – 1 ml) e enviados para o *Power Lab 4/30 Stimulator* (ADInstruments) para obtenção dos registros dos parâmetros.

### **2.5.5 - Obtenção do lavado bronco alveolar**

48 horas após o último desafio antigênico, os animais foram anestesiados com xilazina (12 mg/kg) (Ceva) e cetamina (80 mg/kg) (Ceva) e foi realizada a coleta do lavado bronco alveolar (BAL), através da exposição da traqueia e inserção de uma seringa de 1 mL. O pulmão foi lavado cinco vezes com *Phosphate Saline Buffer* (PBS) em volume final de 1 mL e o lavado broncoalveolar recolhido foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e armazenado em ultra freezer (-80°C).

### **2.5.5 - Coleta de tecido pulmonar**

Assim que o BAL foi coletado, foi realizada uma incisão no ventrículo esquerdo do coração dos animais para coleta de sangue e, conseqüentemente, limpeza do órgão. Posteriormente, o pulmão foi retirado, o lado esquerdo foi colocado em solução de paraformaldeído 4% e o lado direito foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

### **2.5.6 - Determinação de biomarcadores pulmonares por meio de FTIR**

Considerando que a espectroscopia no infravermelho é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente, avaliou-se a composição do BAL utilizando o espectrômetro de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) em regiões com espectro

eletromagnético entre 4000  $\text{cm}^{-1}$  e 400  $\text{cm}^{-1}$ . Estas técnicas permitem identificar com grande acurácia as terminações C-H, O-H e N-H de proteínas, a composição lipídica e compostos glicídicos. Dois microlitros das amostras foram inseridos diretamente no cristal e após protocolo de secagem (jato de ar por 3 minutos), foi realizada a aquisição dos espectros.

Os dados foram normalizados pelo método do vetor, tiveram suas linhas de base corrigidas e posteriormente realizou-se a análise da área das bandas obtidas no espectro através do programa Opus 6.5 (*Bruker*) e em seguida, foram salvos em formato txt e os gráficos plotados no programa Origin Pro 9.0.

### 2.5.7 – Análise Estatística

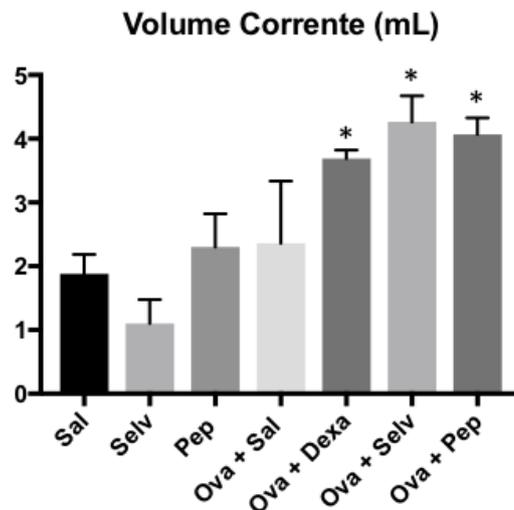
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (Erro Padrão da Média) e foram comparados por meio de análise de variância ANOVA de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional *GraphPadPrism* versão 5.0 utilizando o nível de significância de 5% (valor descritivo de  $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Avaliações Parâmetros Eletrofisiológicos Respiratórios

Na análise do volume corrente (Figura 4), foi observado que os animais tratados com OVA + DEXA, OVA+ PEP e OVA + SELV apresentaram um aumento do volume corrente de ar nos pulmões ( $p < 0,05$  em todos os grupos) em relação aos grupos controle (SAL) (\*diferença em relação ao grupo controle salina). O grupo SELV apresentou maior efeito de tratamento e, conseqüentemente, maior volume corrente, demonstrando ser capaz de controlar a crise asmática.

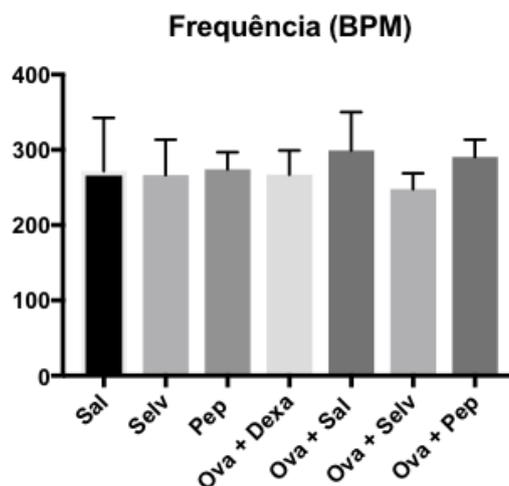
**Figura 4.** Avaliação do volume corrente. Animais não asmáticos com controle salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA + SAL), Animais asmáticos tratados com Dexametasona (OVA + DEXA), Animais asmáticos tratados com fago selvagem (OVA + SELV), Animais asmáticos tratados com F7-PLI (OVA + PEP).



Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. e analisados por One-way ANOVA seguido por *Mann-Whitney test* (\* $p < 0,05$  para análises comparadas ao grupo controle (SAL)).

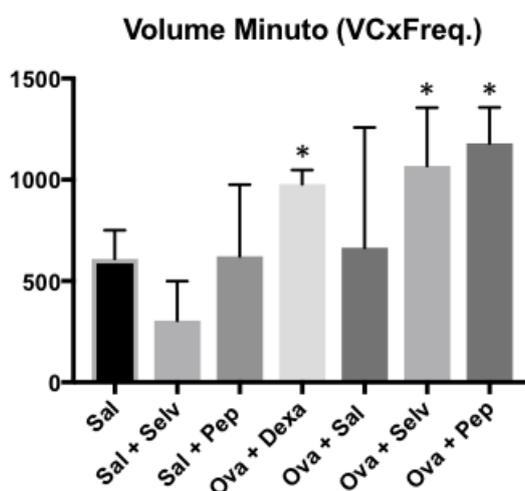
A frequência respiratória (Figura 5), não foi alterada entre os grupos ( $p > 0,05$ ), no entanto, os grupos tendem a uma diminuição da frequência após a administração dos tratamentos com DEXA, SELV e PEP, quando comparados aos grupos controle (SAL) e asmáticos (OVA + SAL).

**Figura 5.** Avaliação da frequência respiratória. Animais não asmáticos com controle salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA + SAL), Animais asmáticos tratados com Dexametasona (OVA + DEXA), Animais asmáticos tratados com fago selvagem (OVA + SELV), Animais asmáticos tratados com F7-PLI (OVA + PEP). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. analisados por *One-way ANOVA* seguido por *Mann-Whitney test* (\* $p < 0,05$  para análises comparadas ao grupo controle (SAL)).



Quanto ao registro do volume minuto (Figura 6), observou-se que os animais asmáticos (OVA) tratados com DEXA, SELV e PEP apresentaram um aumento ( $p < 0,05$  para todos) em relação aos animais do grupo controle (SAL). Além disso, os animais do grupo OVA + PEP apresentaram significância ( $p < 0,05$ ) com relação ao grupo controle (SAL).

**Figura 6.** Avaliação do volume minuto (Volume Corrente x Frequência). Animais não asmáticos com controle salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA + SAL), Animais asmáticos tratados com Dexametasona (OVA + DEXA), Animais asmáticos tratados com fago selvagem (OVA + SELV), Animais asmáticos tratados com F7-PLI (OVA + PEP). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. analisados por One-way ANOVA seguido por *Krisskall-Wallis test* ( $*p < 0,05$  para análises comparadas ao grupo controle (SAL)).

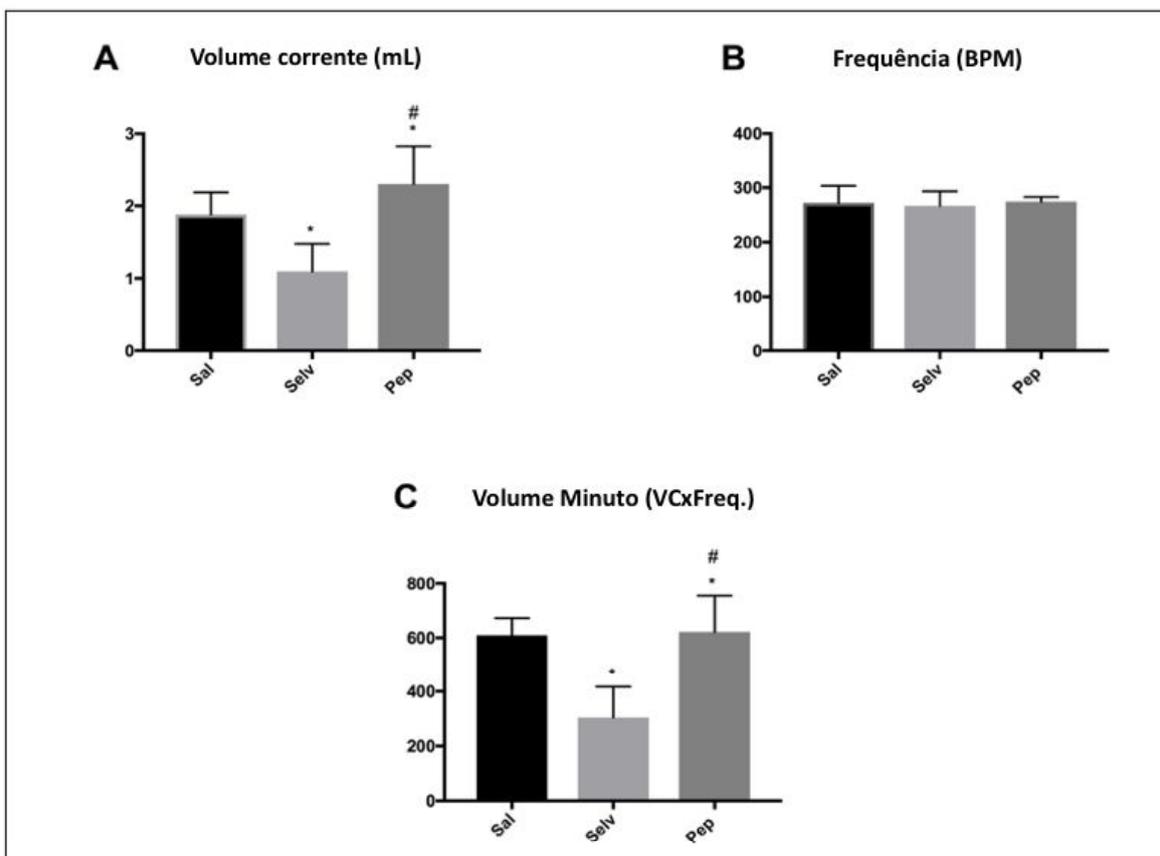


### 3.2 Análises Complementares dos Parâmetros Eletrofisiológicos Respiratórios

Foi feita uma análise complementar dos parâmetros eletrofisiológicos respiratórios para os grupos de animais não asmáticos, com o objetivo de visualizar as respostas dos fagos utilizados PEP e SELV, F7-PLI e Selvagem respectivamente, e do veículo (Salina) quando atuando de forma isolada. Analisou-se o volume corrente (Figura 7 A), os animais do grupo de tratamento PEP apresentaram aumento volume de ar ( $* p < 0,05$ ) quando comparado aos animais do grupo controle (SAL). As análises dos animais do grupo tratado SELV mostraram diminuição ( $*p > 0,05$ ) quando comparadas com o grupo controle (SAL). No entanto, o grupo tratado PEP apresentou aumento ( $\# p < 0,05$ ) com relação ao grupo tratado SELV. A frequência respiratória analisada (Figura 6 B), não se apresentou alterada quando comparada entre os grupos ( $p > 0,05$  em todos os grupos). Ao analisar os dados do volume minuto (Figura 6 C), os animais do grupo de tratamento PEP apresentaram aumento ( $* p < 0,05$ ) quando comparados

aos animais do grupo controle (SAL), enquanto os animais do grupo tratado SELV apresentaram diminuição ( $*p > 0,05$ ) quando comparadas com o grupo controle (SAL).

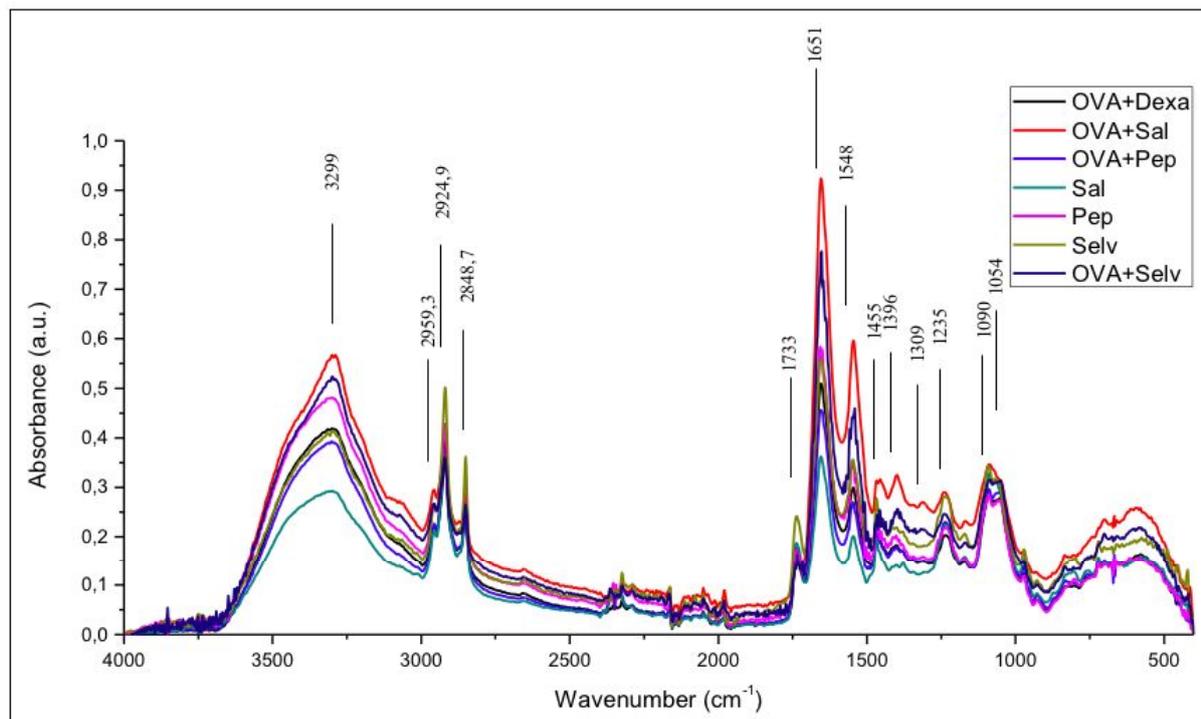
**Figura 7.** Avaliação do volume corrente (A), Frequência (B) e Volume Minuto (Volume Corrente x Frequência) (C). Animais não asmáticos com controle salina (SAL), Animais não asmáticos tratados com fago selvagem (SELV), Animais não asmáticos tratados com F7-PLI (PEP). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 36 animais analisados por One-way ANOVA ( $* p < 0,05$  para análises comparadas ao grupo controle (SAL);  $\# p < 0,05$  para análises comparadas com o grupo SELV).



### 3.3 Determinação de biomarcadores pulmonares por meio de FTIR

As bandas espectrais obtidas a partir da análise pelo FTIR nas amostras de BAL, apresentam vários picos de absorvância (Figura 8), dentre os quais o pico de absorvância do grupo de animais asmáticos sem tratamento (OVA + SAL) se destaca, quando comparado com o espectro dos demais. Esse pico foi detectado em torno de 1651  $\text{cm}^{-1}$  e sua análise revela que essa região representa a substância amida, composto orgânico que pode ser proveniente da geração de radicais livres pelo organismo.

**Figura 8.** Análise da área das bandas obtidas pelo FTIR do BAL de animais dos diferentes grupos. 3299 - Bandas Amida A resultantes dos modos de estiramento N-H em proteínas e ácidos nucleicos; 2959,3 - alongamento C-H; 2924,9 - C-H bandas de alongamento em tecidos normais; 2848,7 - Colesterol, fosfolipídios e creatina; 1733 - C=O alongamento (lipídios); 1651 - Amida I; 1548 - Amida II; 1455 - C-O-H; 1396 - flexão simétrica de CH<sub>3</sub> dos grupos metila das proteínas; 1309 - Amida III; 1235 - Composto por amida III, bem como vibração de fosfato de ácidos nucleicos; 1090 - Faixa de manose e manose-6-fosfato / éster de fosfato (C-O-P); 1054 - Ligação do oligossacarídeo C-O no grupo hidroxila que pode interagir com alguns outros componentes da membrana.



Na análise do BAL por FTIR (Figura 9), pode-se observar que os picos de absorbância dos animais asmáticos tratados com salina (OVA + SAL) tendem a aumentar (pico característico 1651 cm<sup>-1</sup>), enquanto os picos de absorbância dos grupos animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA + DEXA) e animais asmáticos tratados F7-PLI (OVA + PEP) apresentam uma diminuição, tendendo à normalidade.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se os efeitos fisiológicos de um fago expressando um peptídeo mimético ao inibidor de PLA2 (F7-PLI) em animais submetidos a um modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina. Os principais conhecimentos adquiridos com este trabalho foram que os animais asmáticos tratados com peptídeo F7-PLI apresentaram maior fluxo de ar nos pulmões, quando comparados com o grupo controle salina,

e, futuramente, deseja-se analisar se esse dado estaria ligado a uma diminuição na inflamação, devido à inibição da enzima PLA2 e, conseqüentemente, à diminuição dos níveis de mediadores inflamatórios que a recrutam. Outros modelos experimentais de asma alérgica induzida por ovalbumina também apresentam estes parâmetros eletrofisiológicos (MRUWAT *et al.*, 2013; SHOSEYOV *et al.*, 2005). A caracterização dos efeitos fisiológicos respiratórios desencadeadas pela asma foi demonstrada pela análise funcional respiratória, evidenciada no aumento dos volume corrente e volume minuto, demonstrando que o tratamento com o fago F7-PLI foi capaz de reverter as alterações inflamatórias desencadeadas pela asma.

De acordo com QAMAR *et al.* (2014), a composição bioquímica de amostras varia entre animais saudáveis e doentes/tratados e fornece a base para análises metabolômicas, que tem ganhado credibilidade na comunidade científica. Os pulmões são suscetíveis a lesões, devido a sua interação com o ambiente, grande área superficial, alta vascularização e camada epitelial fina. Qualquer condição de doença é capaz de impor uma interferência nos dados que se pretende obter como referência de análises fisiológicas de animais saudáveis. A inflamação é a característica mais comum nas várias doenças pulmonares existentes e pode causar alterações na composição bioquímica do organismo, afetando assim a presença de metabólitos nos pulmões.

No presente experimento, os resultados das análises de FTIR identificaram a presença de diversos metabólitos tanto nos animais saudáveis, quantos nos animais asmáticos tratados e um desses metabólitos se destacou entre eles, a amida. Este composto orgânico normalmente está associado ao estresse oxidativo, que consiste no desequilíbrio entre a formação e a remoção de agentes oxidantes no organismo, proveniente da geração excessiva de radicais livres, como a hidroxila, alcoxila, peroxila e hidroperoxila (BURBURAN, 2013). De acordo com a autora, a ocorrência de um estresse oxidativo moderado, usualmente está associada ao correspondente aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, visando o restabelecimento do equilíbrio entre oxidação-antioxidação, que pode resultar do processo inflamatório e da produção de radicais livres por macrófagos, neutrófilo e eosinófilos. Contudo, a importância do estresse oxidativo na patogênese e progressão da asma tem despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica (MICHAELOUDES *et al.*, 2011a; PELAIA *et al.*, 2012).

Portanto, a inibição da atividade da PLA2 pode ser considerada uma estratégia terapêutica promissora no tratamento de doenças inflamatórias / alérgicas, pois pode suprimir a produção de várias classes de mediadores lipídicos patogênicos (prostaglandinas, leucotrienos, fator agregante plaquetário, lisofosfolipídeos) (ALENCAR *et al.*, 2005; BORGES, 2010).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de doenças alérgicas / inflamatórias e apesar do grande avanço científico no entendimento da importância da enzima PLA2 na inflamação da asma alérgica, ainda é necessário correlacionar os biomarcadores da doença com parâmetros clássicos de indicação de severidade de doenças crônicas como a asma. Isto permitirá a criação de novas estratégias tanto para o estabelecimento de terapias para restaurar as condições normais no organismo, como para sua utilização no diagnóstico precoce, possibilitando assim um tratamento mais rápido e eficaz da doença. As vias de sinalização e mecanismos moleculares pelos quais ocorrem a diminuição de fluxo de ar na asma ainda precisam ser mais investigados, embora os dados desse estudo possam fornecer um conhecimento adicional sobre o fago expressando o peptídeo mimético ao inibidor de PLA2 (F7-PLI) como uma possível droga contra a inflamação pulmonar.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.32, n.7, p. 447-474, 2006

ABBAS, A. K.; et al. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AKINBAMI, L.J.; et al. Asthma outcomes: health care utilization and costs. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.129, p. 49-64, 2012.

ALMEIDA, G. R. Prospecção e caracterização de peptídeos recombinants miméticos a antígenos totais de herpesvírus bovino 1 por meio de phage display. **Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ)**, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2015.

BATEMAN, E. D. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **European Respiratory Journal**, v.31, p. 143-178, 2008.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 749-767, 2010.

BURKE, J. E.; et al. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal Lipid Research**, p. 237-242, 2009.

CHILTON, F. H. et al. Antigen-induced generation of lysophospholipids in human airways. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, p. 2235-2245, 1996.

CHUNG, Y. W., et al. Allergen-induced proteolytic cleavage of annexin-1 and activation of cytosolic phospholipase A2 in the lungs of a mouse model of asthma. **Proteomics**, v.4, p. 3328-3334, 2004.

CONRAD, M. L. et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 1246–1254, 2009.

DENNIS, E. A. History, classification, structure and function of phospholipase A2. **Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Diseases**, v. 24, p. 1–7, 1997.

DUNM, R.D., et al. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1533, p. 29–37, 2001.

FRICKER, M. et al. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 9, p. 629–645, 2014.

FORTES-DIAS, C. L.; et al. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattle snake (*Crotalus durissus terrificus*). **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p. 15646–15651, 1994.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v.40, p. 481–484, 2002.

GIMENEZ, S. N. C., et al. Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$  – type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58-66, 2014.

Global Initiative for Asthma (**GINA**). Pocket guide for asthma management and prevention. Based on the global strategy for asthma management and prevention. Disponível em: [www.ginasthma.com](http://www.ginasthma.com). 2016. Acesso em: 20 de junho de 2018.

Global Initiative for Asthma (**GINA**). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2018. Disponível em: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org). Acesso em: 20 de Junho de 2018.

HALLSTRAND, T. S.; et al. Secreted phospholipase A2 group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.176, p. 1072-1078, 2007.

HELLER, A.; et al. Lipid Mediators in Inflammatory Disorders. **Drugs**, v.55(4); p. 487-496, 1998.

INOUE, S.; et al. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **Biological Chemistry**, v.266, p. 1001–1007, 1991.

JACOBSEN, E. A.; et al. Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 44, p. 1119–1136, 2014.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica, 13ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.**

LEMANSKE, R. F.; et al. Asthma: Clinical expression and molecular mechanisms. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.125(2), p. 95-102, 2010.

MILLER, R. L.; et al. Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.177, n.6, p.567–573, 2008.

MINEO, J. R.; et al. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª Ed, Ed. EDUFU, p. 81-111, 2005.

Ministério da Saúde. **Disponível em:**<http://www.brasil.gov.br/editoria/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros> Acesso em: 20 de junho de 2018.

MONTEIRO, R. et al. Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to pulmonary emphysema: experimental study in rats. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.19, n.4, p.341-347, 2004.

MRUWAT, R.; et al. Phospholipase A2 in Experimental Allergic Bronchitis: A Lesson from Mouse and Rat Models. **PLOS ONE**, v.8(10), p. 1-9, 2013.

OFFER, S.; et al. Negative feedback between secretory and cytosolic phospholipase A2 and their opposing roles in ovalbumin-induced broncho constriction in rats. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. 523–529, 2005.

OHKURA, N.; et al. Isolation and characterization of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra, *Najanajakaouthia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.200, p. 784–788, 1994.

PAWANKAR, R. et al. State of World Allergy Report 2011: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. **World Allergy Organization Journal**, p. S4-S17, Jun. 2011.

PERALES, J.; et al. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **European Journal Biochemistry**, v.227, p. 19–26, 1995.

QAMAR, W. et al. Metabolomic analysis of lung epithelial secretions in rats: an investigation of bronchoalveolar lavage fluid by GC-MS and FT-IR. **Experimental Lung Research**, v. 40, p. 460-466. 2014.

QUIRÓS, S.; et al. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new alpha-type phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoidesnummifer* (Viperidae: Crotalinae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, p. 60-68, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada a experimentação animal. 3ed. Belo Horizonte: **FEP MVZ Editora**, p. 265, 2007.

SANE, A.C.; et al. Secretory phospholipase A2 activity is elevated in bronchoalveolarlavagefluidafterovalbuminsensibilizationofguineapigs. **Journal of Leukocyte Biology**, v.60, p. 704-709, 1996.

SHOSEYOV, D.; et al. Treatment of ovalbumin-induced experimental allergic bronchitis in rats by inhaled inhibitor of secretory phospholipase A2. **Thorax**, v.60, p. 747–753, 2005.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage display. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 391-410, 1997.

SULAIMAN ALHASSAN, M. D. et al. Asthma. **Critical Care Nursing Quarterly**, v. 39, n. 2, p. 110-123, 2016.

THWIN, M. M.; et al. Functional site of endogenous phospholipase A2 inhibitor from python serum. Phospholipase A2 binding and anti-inflammatory activity. **European Journal Biochemistry**, v.269, p. 719–727, 2002.

TO, T. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**, v. 12, p. 3-8, 2012.

TRIGGIANI, M.; et al. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: Not just enzymes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, p. 1000–1006, 2005.

VODNIK, M. et al. Phage Display: Selecting straws instead of a needle from a haystack. **Molecules**, v.16, n.1, p.790-817, 2011.

YODER et al. Bioactive Lysophosphatidylcholine 16:0 and 18:0 Are Elevated in Lungs of Asthmatic Subjects. **Allergy Asthma Immunology Research**, v.6(1), p. 61-65, 2014.

