

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> como uma nova ferramenta  
para o tratamento da asma**

Líris Marini Dias Coelho

Uberlândia

2019

LÍRIS MARINI DIAS COELHO

**Peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> como uma nova ferramenta  
para o tratamento da asma**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em:

Área de concentração: Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart  
Filho

Coorientador: Thulio Marquez Cunha

Uberlândia

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
 Aplicada  
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |  |                 |              |                       |             |
|------------------------------------|--|-----------------|--------------|-----------------------|-------------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Imunologia e Parasitologia Aplicadas   |                 |              |                       |             |
| Defesa de:                         | Dissertação de Mestrado Acadêmico número 259 do PPIPA                        |                 |              |                       |             |
| Data:                              | Trinta e um de outubro de dois mil e dezenove                                | Hora de início: | 14 h e 0 min | Hora de encerramento: | 16h e 30min |
| Matrícula do Discente:             | 11722IPA006  |                 |              |                       |             |
| Nome do Discente:                  | Líris Marini Dias Coelho   |                 |              |                       |             |
| Título do Trabalho:                | Peptídeo mimético ao inibidor de PLA2: uma nova ferramenta no estudo da asma |                 |              |                       |             |
| Área de concentração:              | Imunologia e Parasitologia Aplicadas   |                 |              |                       |             |
| Linha de pesquisa:                 | Imunopatologia e Alergia   |                 |              |                       |             |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Marcadores Biomoleculares e Vias de Sinalização em Processos Neoplásicos     |                 |              |                       |             |

Reuniu-se no Bloco 2B, Sala 2B216, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, por conferência web e presencialmente, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Titulares: Ricardo de Amorim Corrêa - FAMED/UFMG (conferência web); Jair Pereira da Cunha Junior - ICBIM/UFU (presencial) e Luiz Ricardo Goulart Filho - IBTEC/UFU (conferência web), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/10/2019, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/10/2019, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo de Amorim Corrêa, Usuário Externo**, em 31/10/2019, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1655290** e o código CRC **A25DD3A6**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C672 Coelho, Liris Marini Dias, 1992-  
2019 Peptídeo mimético ao inibidor de PLA2 como uma nova  
ferramenta para o tratamento da asma [recurso eletrônico] / Liris  
Marini Dias Coelho. - 2019.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart.

Coorientador: Thulio Marquez Cunha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2472>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Goulart, Luiz Ricardo , 1962-, (Orient.). II.  
Cunha, Thulio Marquez , 1979-, (Coorient.). III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, primeiramente, aos animais que foram utilizados no seu desenvolvimento, que cederam suas vidas para que a pesquisa pudesse ser concluída. E nós, a todo momento, nos sentimos gratos e buscamos executar nosso trabalho com todo o respeito que estes animais mereceram.*

*Dedico à minha família, que sempre esteve ao meu lado, dando todo apoio e carinho nesta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço à Deus por ter permitido esta oportunidade em minha vida e estar sempre presente, me proporcionando inteligência, saúde e força para superar as dificuldades e concluir mais um trabalho.*

*Aos meus pais, Silvio e Glauciana, e meu irmão Douglas, pelo apoio, paciência e incentivos para meu crescimento pessoal e intelectual.*

*Ao meu amigo e namorado João, que sempre esteve presente nos momentos de alegrias, dificuldades e conquistas.*

*Aos meus avós, por toda paciência e carinho, me incentivando a seguir em frente e realizar meus sonhos.*

*Aos professores que contribuíram com meu ensino e aprendizado neste caminho, permitindo um crescimento profissional e uma visão pessoal mais abrangente. Em especial, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo pela confiança, paciência e dedicação ao me acompanhar por toda essa trajetória.*

*Aos Profs. Dr. Robinson Sabino da Silva e Dr. Thulio Marquez Cunha, do Laboratório de Fisiologia Integrativa e da Faculdade de Medicina (FAMED), pela contribuição imprescindível na elaboração do modelo experimental, pelas orientações e paciência ao acompanhar o desenvolvimento e conclusão desse projeto.*

*Ao pessoal do grupo de pesquisa em Fisiologia Integrativa, em especial a Léia Cardoso de Souza, por ter dedicado seus finais de semana para me acompanhar e ajudar nos experimentos e pela amizade e companhia nos momentos que passamos juntas.*

*Ao pessoal do Laboratório de Nanobiotecnologia, em especial a Patrícia Lopes, a Fabiana Santos e a Emília Rezende, que muitas vezes dedicaram parte de seu tempo na orientação e realização desse trabalho.*

*A todos que diretamente e indiretamente também contribuíram para a concretização deste trabalho, todo o meu respeito e agradecimento.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq e CAPES pelo financiamento do projeto e a toda equipe do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da UFU pelo auxílio.*

*À Vida, pelos bons momentos que nos alegram e pelos maus momentos que nos transformam.*

## Resumo

A asma é uma doença inflamatória de prevalência global, caracterizada por sintomas como falta de ar, chiado e aperto no peito, decorrentes de uma complexa interação entre inflamação crônica e função desordenada das vias aéreas. Na asma alérgica inclui-se a sensibilização do organismo por um antígeno, que ocasionam alterações nos parâmetros respiratórios, constrição bronquiolar, produção elevada de anticorpos IgE específicos e níveis elevados de eosinófilos e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Em virtude disso, neste estudo investigamos se um peptídeo que mimetiza o inibidor da PLA<sub>2</sub> poderia imitar seu efeito imunomodulador, governando o processo inflamatório no trato respiratório e servir como uma nova estratégia terapêutica. O peptídeo (PF7), um bacteriófago (fF7) e dexametasona (DEXA) foram administrados como tratamentos a camundongos Balb/C machos via intranasal, após sensibilização e desafios antigênicos por ovalbumina. Após 48 horas do último desafio e tratamento, os parâmetros eletrofisiológicos respiratórios dos camundongos foram analisados, o líquido de lavagem broncoalveolar (BAL), soro e pulmões foram coletados para análise posterior. Camundongos asmáticos tratados com peptídeo (PF7) tiveram reduções significativas no número de eosinófilos no BAL e níveis de IgE no soro, indicando atenuação do processo inflamatório. Os parâmetros eletrofisiológicos apresentaram melhora no fluxo de nos pulmões. Também foi possível observar na análise ATR-FTIR a presença de amida I e amida II, como potenciais biomarcadores de asma alérgica. Dessa forma, nossos resultados demonstraram que o tratamento com o peptídeo (PF7) atenua o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas na asma induzida por ovalbumina, sustentando a conclusão de que estratégias envolvendo peptídeos podem ser utilizadas como abordagens terapêuticas atraentes no tratamento da asma.

**Palavras-chave:** Asma; Modelo Animal; Ovalbumina; Peptídeo mimético; Fosfolipase A<sub>2</sub>.

## **Abstract**

Allergic asthma is an inflammatory disease of global prevalence, characterized by symptoms as shortness of breath, wheezing and chest tightness, arising from a complex interaction between chronic inflammation and disordered airway function. Allergic asthma includes an organism sensitization by an antigen, which leads to respiratory parameters alterations, bronchiolar constriction, elevated production of specific IgE antibodies and elevated levels of eosinophils and phospholipase A<sub>2</sub> enzymes (PLA<sub>2</sub>). Therefore, in this study, we investigated whether a peptide that mimics PLA<sub>2</sub> inhibitor could mimetize its immunomodulatory effect, governing the inflammatory process in the respiratory tract and serve as a new therapeutic estrategy. These peptide (PF7), a bacteriophage (fF7) and dexamethasone (DEXA) were administered as tretaments to male Balb/C mice via intranasal, after ovalbumin sensitization and antigenic challenges. After 48 hours of the last challenge and treatment, mice respiratory electrophysiological parameters were analyzed, the bronchoalveolar lavage fluid (BAL), serum and lungs were collected for further analysis. Asthmatic mice that received PF7 had significant reductions in number of BAL eosinophils and serum IgE levels, indicating an attenuation of the inflammatory process. Electrophysiological parameters presented a significant improvement in pulmonary airflow. It also was observed by ATR-FTIR analysis the presence of amide I and amide II as potential biomarkers of allergic asthma. Our results demonstrated that treatment with peptide (PF7) attenuates the development of airway inflammation in ovalbumin-induced asthma, supporting the conclusion that strategies using peptides might be developed further as an attractive therapeutic approach in asthma treatment.

**Keywords:** Asthma; Animal Model; Ovalbumin; Mimetic Peptide; Phospholipase A<sub>2</sub>.

## LISTA DE ABREVIACÕES

**Al(OH)<sub>3</sub>**: Hidróxido de alumínio

**ANOVA**: Análise de variância

**ATR-FTIR**: Espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada

**BAL**: Lavado broncoalveolar

**CEUA**: Comitê de Ética no Uso de Animais

**DEXA**: Dexametasona

**fF7**: Bacteriófago em fusão com sequência mimética ao inibidor de PLA<sub>2</sub>

**I.n.**: Instilação Intranasal

**I.p.**: Via intraperitoneal

**IBTEC**: Instituto de Biotecnologia

**ICBIM**: Instituto de Ciências Biomédicas

**OVA**: Ovalbumina

**PF7**: Peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub>

**PLA<sub>2</sub>**: Fosfolipase A<sub>2</sub>

**PLIs**: Proteínas inibidoras de PLA<sub>2</sub>

**REBIR**: Rede de Biotérios da UFU

**Rpm**: Rotações por minuto

**S.c.**: Administração subcutânea

**SEM**: Erro Padrão da Média

**SAL**: Solução salina estéril (0,9%)

**UFU**: Universidade Federal de Uberlândia

**CV**: Células viáveis

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Prevalência mundial de asma clínica.

**Figura 2.** Protocolo Experimental utilizado na indução e tratamento de asma.

**Figura 3.** Coleta do lavado broncoalveolar (BAL).

**Figura 4.** Viabilidade celular na linha celular epitelial brônquica humana.

**Figura 5.** Parâmetros eletrofisiológicos respiratórios.

**Figura 6.** Morfologia do tecido pulmonar e teor de água no pulmão.

**Figura 7.** Contagem de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL).

**Figura 8.** Níveis de IgE OVA-específicos no soro.

**Figura 9.** Concentração total de proteínas e citocinas inflamatórias no lavado bronco alveolar (BAL).

**Figura 10.** Determinação de biomarcadores pulmonares usando espectroscopia ATR-FTIR.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>1.1 Objetivos</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>1.2 Objetivos Específicos</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>2.1 Aspectos éticos</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>2.2 Local de Estudo</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>2.3 Animais</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>2.4 Caracterização e Tamanho da Amostra</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>2.5 Protocolo Experimental</b> .....   | <b>16</b> |
| <b>2.6 Viabilidade Celular</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2.7 Avaliação dos Parâmetros Eletrofisiológicos Respiratórios</b> .....                    | <b>18</b> |
| <b>2.8 Análise Histopatológica dos pulmões e Relação Pulmonar peso seco/ peso úmido</b> ..... | <b>18</b> |
| <b>2.9 Coleta de Lavado Broncoalveolar (BAL)</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>2.10 Títulos de Anticorpos IgE</b> .....   | <b>20</b> |
| <b>2.11 Concentração de proteínas e citocinas inflamatórias no BAL</b> .....                  | <b>21</b> |
| <b>2.12 Determinação de biomarcadores pulmonares usando ATR-FTIR</b> .....                    | <b>21</b> |
| <b>2.13 Análise estatística</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>3. RESULTADOS</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>3.1 Viabilidade Celular</b> .....  | <b>22</b> |
| <b>3.2 Avaliação dos Parâmetros Eletrofisiológicos Respiratórios</b> .....                    | <b>23</b> |
| <b>3.3 Análise Histopatológica dos pulmões e Relação Pulmonar peso seco/ peso úmido</b> ..... | <b>24</b> |
| <b>3.4 Coleta de Lavado Broncoalveolar (BAL)</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>3.5 Títulos de Anticorpos IgE</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>3.6 Concentração de proteínas e citocinas inflamatórias no BAL</b> .....                   | <b>27</b> |
| <b>3.7 Determinação de biomarcadores pulmonares usando ATR-FTIR</b> .....                     | <b>28</b> |
| <b>4. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>29</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>33</b> |
| <b>ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA</b> .....  | <b>38</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas que afeta cerca de 339 milhões de pessoas em todo o mundo (Figura 1) e pode ser caracterizada por sintomas típicos, como falta de ar, tosse, chiado e aperto no peito, que surgem de uma interação complexa entre inflamação crônica e função desordenada das vias aéreas. (Brigham *et al.*, 2015; Global Asthma Network, 2018; GINA, 2019). Na asma alérgica, ocorre uma sensibilização por um mecanismo desconhecido, envolvendo uma apresentação de antígeno ao sistema imunológico e ocasionando um aumento na produção de anticorpos IgE específicos e no número de eosinófilos nos pulmões, os quais tem a capacidade de atuar como células efetoras durante o processo inflamatório (Kool *et al.*, 2008; Akuthota *et al.*, 2011; Possa *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2015; Weissler *et al.*, 2017).

A análise das funções pulmonares facilita a quantificação da severidade da obstrução das vias aéreas na asma e pode ser feita a partir do diagnóstico do paciente, no qual inclui-se a espirometria, uma técnica que avalia os parâmetros eletrofisiológicos respiratórios, como volume corrente, frequência respiratória e volume minuto (volume corrente x frequência respiratória), nos quais observa-se a limitação do fluxo aéreo, que pode ser provocada pela constrição bronquiolar e pelas alterações no tecido epitelial dos pulmões (Jacobsen *et al.*, 2014; Ferguson *et al.*, 2017).

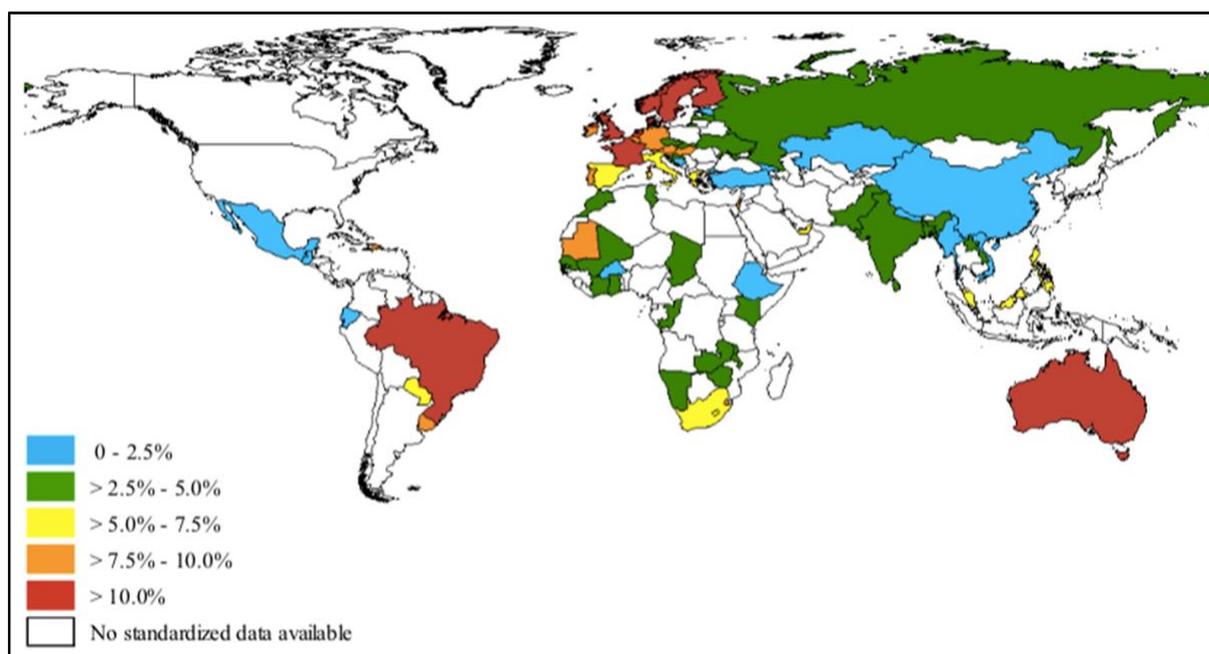


Figura 1. Prevalência mundial de asma clínica. Fonte: TO *et al.*, 2012.

Os modelos experimentais animais de doenças respiratórias alérgicas induzidas por ovalbumina (OVA) tem sido amplamente utilizados afim de demonstrar a eficácia terapêutica de fármacos e elucidar mecanismos imunológicos envolvidos na patologia da asma (Aun *et al.*, 2017). Camundongos tem se tornado a espécie mais utilizada nesses modelos, que buscam imitar no animal as patofisiologias apresentadas nos pacientes asmáticos e incluem duas fases: a sensibilização e o desafio antigênico (Kung *et al.*, 1994). Os parâmetros respiratórios e amostras coletadas, como pulmões, lavado broncoalveolar (BAL), sangue e soro, podem ser aplicados em experimentos que analisam desde a inflamação pulmonar e sua composição bioquímica, que pode ser feita através da identificação de biomarcadores específicos das vias aéreas e facilitam a detecção de moduladores inflamatórios, até o fluxo respiratório pós tratamento (Moldaver *et al.*, 2011; Bayes *et al.*, 2016).

Alguns estudos demonstraram que os níveis da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) se encontram elevados nos pulmões de camundongos asmáticos durante o processo inflamatório e este, tem sido reconhecido como um fator importante no influxo de células imunes nas vias aéreas (Hurley *et al.*, 2008; Mruwat *et al.*, 2013). Além disso, a enzima secretora PLA<sub>2</sub> participa de vários fenômenos biológicos anti-inflamatórios, atuando na membrana fosfolipídica e liberando diferentes mediadores lipídicos durante o processo inflamatório alérgico, como prostaglandinas e leucotrienos, os quais oferecem uma atrativa abordagem terapêutica no desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de inflamações e lesões teciduais (Murakami *et al.*, 2014; Dubinin *et al.*, 2016).

A ativação da família PLA<sub>2</sub> é um processo chave na produção de precursores da biossíntese de mediadores inflamatórios lipídicos e a inibição dessa enzima pode resultar na supressão de classes importantes de lipídios inflamatórios (Gimenes *et al.*, 2017). As proteínas inibidoras da PLA<sub>2</sub> são denominadas PLIs e podem ser obtidas do plasma de serpentes e classificadas em diferentes classes:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , de acordo com as regiões que a reconhecem e inibem suas atividades (Inoue *et al.*, 1991). Uma região parcialmente semelhante à enzima PLA<sub>2</sub> foi encontrada na sequência primária da proteína  $\gamma$ dCdcPLI e a partir disto, um peptídeo mimético ao inibidor desta (PF7) e um bacteriófago em fusão com a mesma sequência deste peptídeo (fF7), foram selecionados e utilizados neste trabalho (Gimenez *et al.*, 2014).

Os peptídeos são produtos de condensação de dois ou mais aminoácidos e são a escolha preferida da terapêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos, devido aos seus efeitos colaterais reduzidos, toxicidade e metabolismo previsível (Goyal *et al.*, 2019). Essas moléculas estão ganhando cada vez mais atenção, pois são capazes de interagir com um grande

número de alvos farmacológicos, atuando como moduladores da inflamação e permitindo seu uso em métodos terapêuticos (Molek *et al.*, 2011).

A seleção dos peptídeos de interesse é feita a partir de 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 (p3 ou p8) são tipicamente utilizados (Bratkovic *et al.*, 2010). De acordo com alguns estudos, grandes populações de fagos podem ser selecionadas por uma técnica chamada *biopanning*, para produzir fagos ligantes que exibem o comportamento alvo desejado (Vodnik *et al.*, 2011). Dessa forma, a sequência de interesse selecionada pode então ser utilizada para analisar os efeitos fisiológicos na via de inibição da enzima PLA<sub>2</sub> em animais asmáticos.

## 1.2 OBJETIVO

Como a inflamação é um componente-chave que representa a patologia de muitas doenças pulmonares, nosso objetivo foi investigar a eficácia do peptídeo PF7 (peptídeo mimético ao inibidor da PLA<sub>2</sub>) como uma abordagem terapêutica para a asma, diminuindo o processo inflamatório em camundongos saudáveis e asmáticos.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Instilar o camundongo com o peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> contendo o peptídeo inibidor específico conjugado em sua superfície para verificar o efeito do fago como veículo;
- Analisar a estrutura alveolar e brônquica por meio de hematoxilina e eosina (HE);
- Determinação de edema pulmonar por meio de peso seco/peso úmido;
- Analisar a presença de eosinófilos no lavado broncoalveolar;
- Analisar o perfil proteico e lipídico do BAL por meio de espectroscopia ATR-FTIR;
- Quantificar a presença de citocinas inflamatórias no BAL.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU - Licença nº 103/2018), de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.2 LOCAL DE ESTUDO**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) e na Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).

### **2.3 ANIMAIS**

Camundongos Balb/C machos (n = 48) entre 8 - 12 semanas, pesando 20-45g, foram mantidos no biotério em condições padrão ( $22 \pm 1$  ° C, 12/12 h luz/ciclo escuro com comida e água disponíveis ad libitum), conforme recomendado no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

### **2.4 CARACTERIZAÇÃO E TAMANHO DA AMOSTRA**

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado de acordo com os dados de análise de modelos de estudo em asma no trabalho de Shoseyov (2005), o qual é baseado nos valores médios e desvio padrão dos dados da variável mais instável a ser medida.

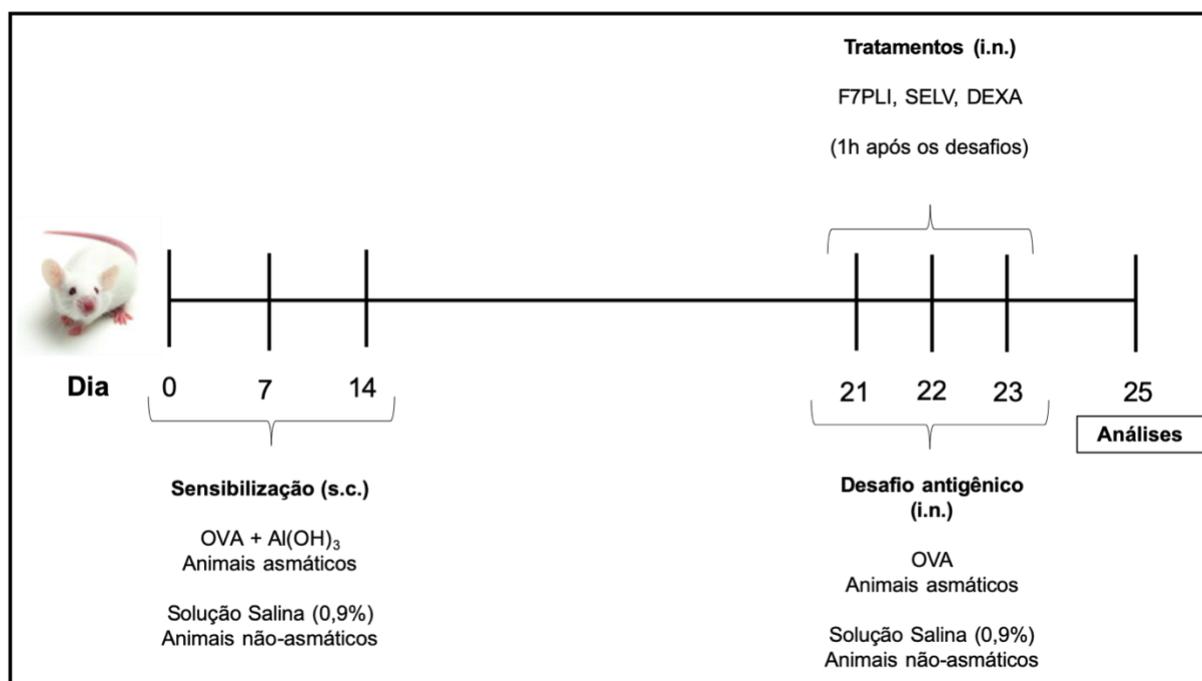
Desta forma, para compor a amostra o número de animais foi dividido aleatoriamente em 8 grupos experimentais:

- 1) Não-asmáticos (SAL, n = 6),
- 2) Asmáticos (OVA + SAL, n = 6),

- 3) Não-asmáticos tratados com peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> (SAL + PF7, n = 6),
- 4) Não asmáticos tratados com fago fF7 (SAL + fF7, n = 6),
- 5) Não asmáticos tratados com Dexametasona (SAL + DEXA, n = 6),
- 6) Asmáticos tratados com peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> (OVA + PF7, n = 6)
- 7) Asmáticos tratados com fago fF7 (OVA + fF7, n = 6),
- 8) Asmáticos tratados com Dexametasona (OVA + DEXA, n = 6).

## 2.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Nos dias 0, 7 e 14, os animais foram sensibilizados por injeções subcutâneas de solução salina a 0,9% (200 µL) e OVA (50 µg/animal) emulsificada em 0,5 mg/kg de hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) dissolvidos em 200 µL de solução salina a 0,9% para induzir asma (adaptado de Conrad *et al.*, 2009) 20. A fase de sensibilização foi seguida pela administração de uma injeção intraperitoneal (i.p.) de xilazina (12 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) para anestesia nos dias 21, 22 e 23 para que fossem realizados os desafios antigênicos através da instilação intranasal (i.n.) de OVA (25 µg / diluída em 25 µL de solução salina) ou solução salina 0,9% (25 µL). Nos três dias, após 60 minutos de cada desafio, os grupos de camundongos receberam seus respectivos tratamentos por instilação intranasal de dexametasona (2 mg/kg), peptídeo mimético inibidor de PLA<sub>2</sub> (PF7) (100µM diluído em 25µL de solução salina 0,9%) e fago fF7 (10<sup>11</sup> diluído em 25µL de solução salina 0,9%). Os animais do grupo controle negativo (SAL) receberam apenas instilação intranasal de solução salina a 0,9% (25 µL) (Figura 2).



**Fig. 2. Protocolo experimental utilizado na indução e tratamento de asma.** Todos os tratamentos (solução salina (25  $\mu$ L); peptídeo (PF7) (100 $\mu$ M diluído em 25  $\mu$ L de solução salina); fago (fF7) (10<sup>11</sup> diluído em 25  $\mu$ L de solução salina) e dexametasona (2 mg/kg diluído em 25  $\mu$ L de solução salina) foram aplicados 60 minutos após o desafio antigênico, durante 3 dias e a análise respiratória foi realizada 48 horas após o último desafio e tratamentos. (adaptado de Conrad *et al.*, 2009).

O peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> recentemente relacionado e seu uso são reivindicados sob o pedido de patente BR1020160309468, 29 de dezembro de 2016, emitido por Gimenez *et al.* (2014).

## 2.6 VIABILIDADE CELULAR

Uma linhagem celular epitelial brônquica humana (BEAS-2B), foi cultivada e usada em um MTT, uma redução dependente de mitocôndria de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio (brometo de tetrazólio (MTT)) para formazan, para medir a viabilidade celular em diferentes concentrações de tratamento com o peptídeo PF7 (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) e fago fF7 (10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup>), ambos contendo a mesma sequência inibidora de PLA<sub>2</sub>. 24h, 48h e 72h após a adição da solução MTT do composto de teste e as células foram incubadas por mais 4h, a 37°C. Após remoção do sobrenadante, foram adicionados 100  $\mu$ L de SDS-50% de dimetilformamida às células para dissolver o formazan. A absorbância foi medida usando um leitor de microplacas, com comprimento de onda de 592 nm. O grupo controle consistiu em células não tratadas e foi considerado como 100% de células viáveis (CV). Os resultados foram

expressos como porcentagem de células viáveis quando comparados ao grupo controle. A estimativa de células viáveis é obtida pela fórmula:

$$\frac{\text{Células viáveis (\%)} = (\text{absorbância teste} - \text{absorbância branco}) \times 100}{(\text{absorbância CV} - \text{absorbância branco})}$$

Onde a absorbância de CV é a média dos poços de veículo controlado (SDS 50% formaldeído), a absorbância do branco é a absorbância média dos poços em branco (sem células) e a absorbância de teste é a média das absorbâncias dos poços com a substância em estudo.

## **2.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS RESPIRATÓRIOS**

Os animais foram submetidos à análise dos parâmetros eletrofisiológicos respiratórios 48 horas após o último desafio e tratamentos (dia 25 do protocolo experimental). Esse processo avalia a função pulmonar através do volume corrente, frequência respiratória e volume minuto (volume corrente x frequência respiratória) (Barreto & Cavalazzi, 2002). Todos os dados obtidos foram enviados ao estimulador Power Lab 4/30 (ADInstruments, Brasil) e os registros dos parâmetros foram obtidos pelo programa LabChart, descritos em volts e convertidos em mililitros (10 v - 1 mL).

## **2.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES E RELAÇÃO PULMONAR PESO ÚMIDO/PESO SECO**

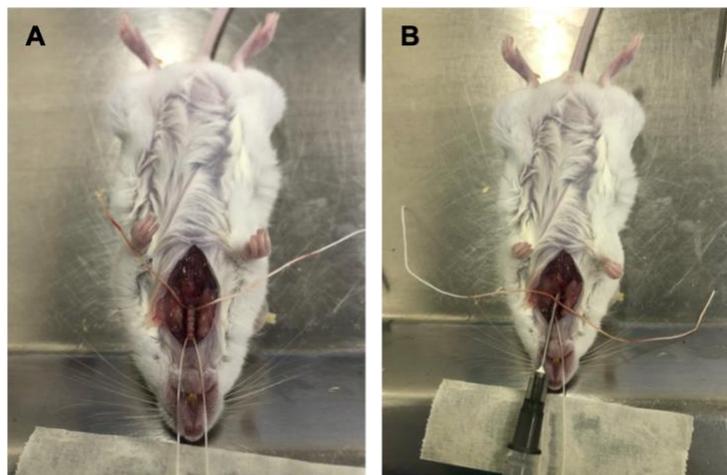
As análises histopatológicas das amostras de pulmão foram realizadas por coloração com hematoxilina-eosina (HE). A traqueia foi pinçada no final da expiração do lavado broncoalveolar (BAL) e os pulmões foram removidos. Para preservar a arquitetura pulmonar, parte dos lobos inferior e médio do pulmão direito foram fixados com formaldeído a 4% em tampão fosfato (PB) antes da inclusão em parafina. As seções pulmonares foram desparafinizadas em xilol e reidratadas com uma série graduada de etanol. Para avaliar os padrões histopatológicos, os tecidos foram cortados em seções de 5 µm e corados com

hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram examinadas por microscópio óptico (Leica ICC50) e fotomicrografias com ampliações de x400 foram obtidas a partir de campos não sobrepostos por seção. O dano das vias aéreas foi quantificado usando um protocolo de pontuação e foram utilizados escores de 0 a 4 para representar a gravidade da inflamação brônquica, com 0 significando nenhum efeito e 4 como efeito máximo da gravidade. Além disso, a extensão dessa característica pontuada por campo foi declarada com uma escala entre 0 e 4, com 0 representando nenhuma evidência visível e 4 com envolvimento completo por campo (quadrantes). Escores específicos para inflamação brônquica foram calculados como o produto da gravidade e extensão da característica e o escore cumulativo de danos nas vias aéreas foi calculado com base na soma dos escores de inflamação brônquica.

A relação peso úmido/peso seco dos pulmões foi utilizada como índice de acúmulo de água nos pulmões após a instilação da OVA. Para medir a quantidade total de água do pulmão, foram utilizadas partes dos pulmões removidos para análise histopatológica. O peso pulmonar foi medido imediatamente após sua excisão (peso úmido) e o tecido foi então seco em estufa a 37°C por 24 horas e o peso seco foi medido. A razão de peso úmido/peso seco foi calculada dividindo-se o peso seco pelo peso úmido.

## **2.9 COLETA DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)**

A coleta do BAL foi realizada 48 horas após o último desafio, sob anestesia. A traqueia dos camundongos foi acessada com uma agulha e 500  $\mu\text{L}$  de solução salina a 0,9% foram injetados lentamente e aspirados três vezes para coletar  $\sim 300 \mu\text{L}$  de lavado broncoalveolar (Figuras 3A e 3B). O BAL recolhido foi centrifugado a 1500 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recolhido e alíquotas foram armazenadas em freezer a -80°C para análises posteriores de células e citocinas inflamatórias. Uma amostra de 50  $\mu\text{L}$  foi utilizada para contagem diferencial de células baseado nos critérios normais de morfologia em uma Câmara de Neubauer, coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa e classificando-as em eosinófilos, com o auxílio de um microscópio óptico com as objetivas de x40 e x100.



**Figura 3. Coleta do lavado broncoalveolar (BAL).** (A) Exposição da traqueia do animal; (B) Inserção da agulha na traqueia e lavagem dos pulmões com 500  $\mu\text{L}$  de solução salina (0,9%).

## 2.10 TÍTULOS DE ANTICORPOS IgE

Após 48 horas após o último desafio da instilação intranasal, quando os animais foram anestesiados terminalmente, foram coletadas amostras de sangue do coração e os níveis de IgE específica do OVA foram medidos por um ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA) no soro. Resumidamente, a placa de microtitulação de 96 poços de fundo redondo foi revestida durante a noite a 4 °C com 50  $\mu\text{L}$  de 2000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de OVA em tampão de carbonato-bicarbonato (pH 9,6). A placa foi lavada três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS a 0,05% de Tween 20 e depois bloqueada por incubação com 300  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA 5% por 1 h à temperatura ambiente (TA). Após lavagem 3 vezes com PBS – Tween 20 a 0,05%, 50  $\mu\text{L}$  de amostras de soro diluídas a 1: 5 em PBS-BSA 0,1% foram adicionadas às placas e incubadas por 2 h à TA. Em seguida, a placa foi lavada 6 vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% e 50  $\mu\text{L}$  de Biologend anti-IgE biotilado diluído a 1: 500 em PBS-BSA 0,1%, foram adicionados e incubados por 1 h à TA. A IgE específica de OVA foi detectada com Estreptavidina conjugada com HRP (diluída 1:500 em PBS-BSA 0,1%) (AbD, Serotec) por incubação durante 30 minutos à TA. Depois disso, a placa foi lavada 6 vezes com PBS-BSA 0,05% e 50  $\mu\text{L}$  de OPD e peróxido de hidrogênio foram adicionados como substrato e incubados à TA por 20 min. A reação foi parada com ácido sulfúrico 2N e a placa foi lida a 492 nm pelo leitor de placas de ELISA Thermo Electron Corporation (Finlândia).

## **2.11 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO BAL**

A concentração de proteínas foi analisada pelo método colorimétrico de Bradford, com base na formação de complexos entre o corante Coomassie Brilliant Blue com a cadeia polipeptídica. Cinco microlitros de amostras de BAL foram colocados em uma microplaca de 96 poços. A absorbância foi obtida com um espectrofotômetro (GENESYS 10S UV-VIS) no comprimento de onda de 595nm.

O kit de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi usado para medir a Interleucina-4 (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) em amostras de BAL, de acordo com o protocolo do fabricante. Os resultados foram interpolados a partir de uma curva padrão usando citocinas recombinantes (pg / mL).

## **2.12 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES PULMONARES USANDO ATR-FTIR**

A análise da composição do BAL usando o espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) foi avaliada em regiões com espectro eletromagnético entre 3000  $\text{cm}^{-1}$  e 400  $\text{cm}^{-1}$ . Essas técnicas permitem identificar com grande precisão as terminações C-H, O-H e N-H das proteínas, a composição lipídica e os compostos glicídicos. Dois microlitros das amostras foram inseridos diretamente no cristal, secos com jato de ar por 3 minutos e o espectro foi adquirido. Os dados foram normalizados pelo método vetorial, tiveram suas linhas de base corrigidas e posteriormente a área de bandas obtida no espectro foi analisada através do programa Opus 6.5 (Bruker) e exportada em formato txt para uso em gráficos, plotada no programa Origin Pro 9.0.

## **2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram relatados como média  $\pm$  E.P.M. (Erro Padrão da Média) e as comparações das médias foram analisadas quanto à significância usando a Análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida de comparações médias no pós-teste de Student-Newman-

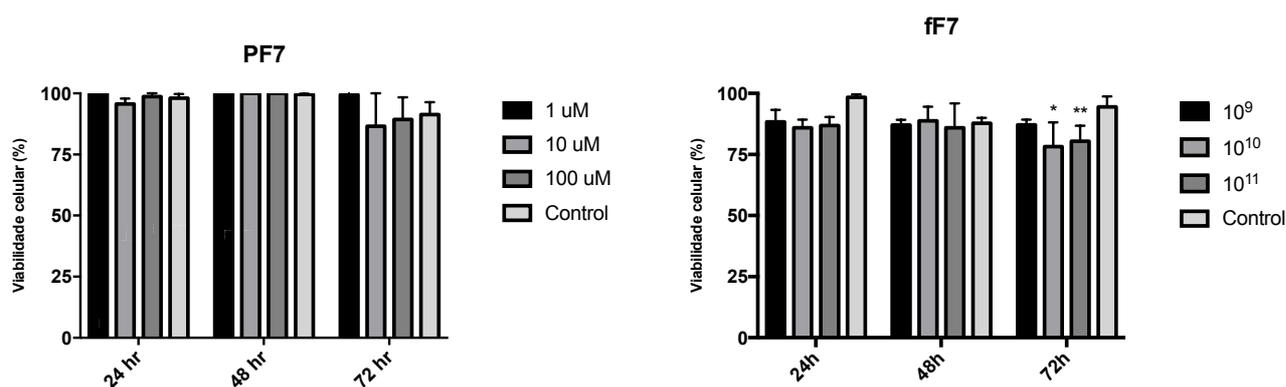
Keuls (GraphPad Prism Software versão 7.0, San Diego, CA, EUA). Valor descritivo de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 VIABILIDADE CELULAR

Na linhagem celular epitelial brônquica humana (BEAS-2B), as concentrações de peptídeo (PF7) testadas ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ) não apresentaram citotoxicidade para as células nos períodos de tempo analisados (24h, 48h e 72h), com morte celular inferior a 5%, quando comparados ao controle positivo (OVA + SAL) (Figura 4A), além de apresentarem viabilidade celular de  $\sim 90,22\%$  (Figura 4A).

Ao analisar a viabilidade celular de BEAS-2B tratada com o bacteriófago (fF7) com concentrações de  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ , observamos que qualquer uma destas apresentava citotoxicidade inferior a 15% nos tempos de 24 e 48 horas e viabilidade celular de 85% (Figura 4B). Além disso, no período de 72 horas, as concentrações de  $10^{10}$  e  $10^{11}$  de fF7 apresentaram uma redução de 16,19% (\*) e 13,94% (\*\*), respectivamente, da viabilidade celular, quando comparadas ao controle positivo (OVA + SAL) (Figura 4B).



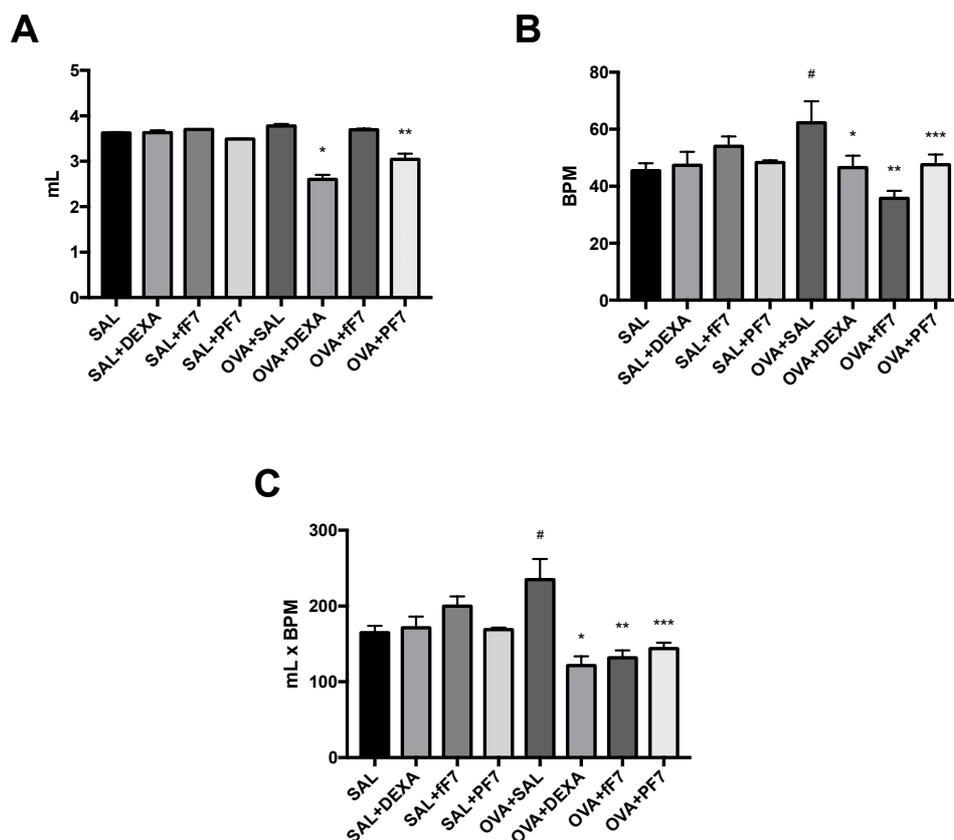
**Figura 4. Viabilidade celular na linha celular epitelial brônquica humana.** Diferentes concentrações dos tratamentos: (A) Peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> (PF7) ( $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ); (B) Bacteriófago (fF7) ( $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ) tratados por 24h, 48h e 72h. Os dados referem-se à média de duas experiências independentes e desvio padrão ( $M \pm DP$ ).

### 3.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS RESPIRATÓRIOS

Na análise do volume corrente, que é o volume de ar inspirado e expirado espontaneamente em cada ciclo respiratório, os camundongos asmáticos tratados com dexametasona (OVA + DEXA) e peptídeo (OVA + PF7) demonstraram uma diminuição no influxo de ar nos pulmões com relação ao grupo controle negativo (OVA + SAL), caracterizando uma melhora no fluxo de ar nos pulmões (Figura 5A). Além disso, o tratamento com o fago (OVA + fF7) não apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos controle positivo (OVA + SAL) e negativo (SAL) (Figura 5A).

Os resultados referentes à frequência respiratória, que se referem ao número de ciclos respiratórios que o animal completa em determinado tempo ou respiração por minuto, apresentaram diminuição nos animais asmáticos tratados (OVA + DEXA; OVA + fF7; OVA + PF7) com relação ao grupo controle positivo (OVA + SAL) (Figura 5B). Contudo, o grupo controle positivo (OVA + SAL) demonstrou frequência respiratória elevada quando comparado ao grupo controle negativo (SAL) (Figura 5B).

No volume minuto, que é a quantidade de ar novo que entra nas vias respiratórias a cada minuto e equivale ao volume corrente multiplicado pela frequência respiratória, observamos que os animais desafiados por OVA e tratados com peptídeo (OVA + PF7), dexametasona (OVA + DEXA) e fago (OVA + fF7) apresentaram uma melhora significativa no fluxo de ar nos pulmões, quando comparado ao grupo controle positivo (OVA + SAL), caracterizando uma diminuição do volume minuto de camundongos asmáticos (Figura 5C).



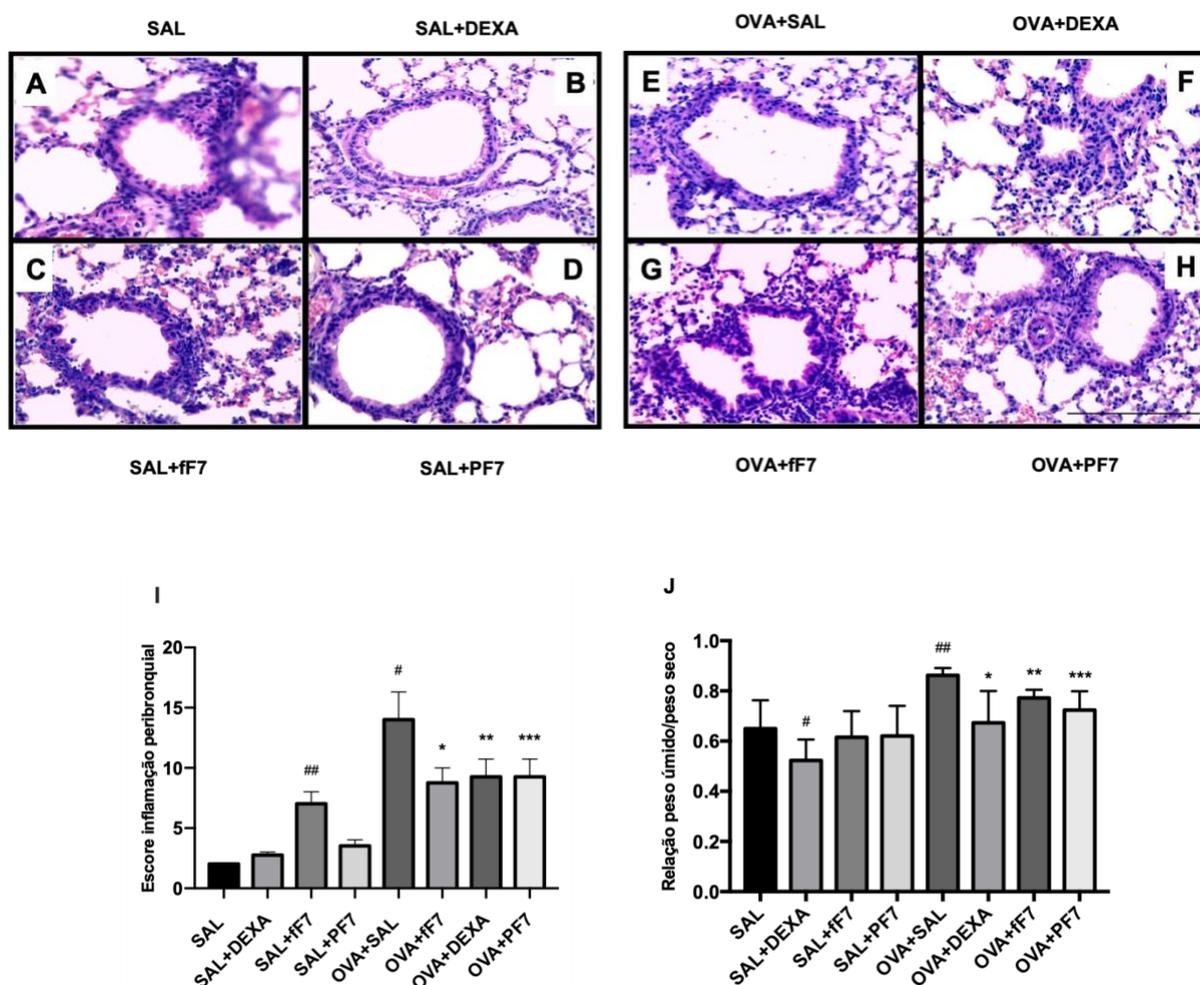
**Figura 5. Parâmetros eletrofisiológicos respiratórios.** (A) Volume corrente (mL); OVA + DEXA vs. OVA + SAL, \*P <0,0001; OVA + PF7 vs. OVA + SAL \*\*P <0,0001. (B) Frequência Respiratória (Batimentos por minutos - BPM); OVA + DEXA vs. OVA + SAL, \*P <0,0001; OVA+ ff7 vs. OVA + SAL, \*\*P <0,0001; OVA + PF7 vs. OVA + SAL, \*\*\*P <0,0001; OVA + SAL vs. AS, #P<0,0001. (C) Volume minuto; OVA + DEXA vs. OVA + SAL, \*P <0,0125; OVA+ ff7 vs. OVA + SAL, \*\*P <0,0125; OVA + PF7 vs. OVA + SAL, \*\*\*P <0,0125; OVA + SAL vs. AS, #P<0,0125. Os dados referem-se às médias + SEM de 4 animais por grupo.

### 3.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES E RELAÇÃO PULMONAR PESO ÚMIDO/PESO SECO

Após a coloração com HE, observou-se que os pulmões do grupo controle negativo (SAL), que não receberam sensibilização alérgica com ovalbumina (Figura 6A), não apresentaram alterações patológicas e estrutura tecidual livre de células inflamatórias, quando comparados ao grupo controle (OVA + SAL), que indicou presença de infiltrado inflamatório de células nas áreas peribrônquicas (Figura 6E, 6I). Camundongos asmáticos tratados com fago (OVA + ff7) (Figura 6G) e peptídeo (OVA + PF7) (Figura 6H) também mostraram presença de infiltrado inflamatório, mas em menor intensidade do que o grupo controle (OVA + SAL). As estruturas alveolares e bronquiolares permaneceram inalteradas. Além disso, os tratamentos

promoveram alterações no infiltrado inflamatório, mas não tiveram efeito na descamação celular no lúmen e no espessamento epitelial (Figuras 6F, 6G, 6H).

Quanto a relação peso úmido/peso seco, os resultados apresentaram um aumento no teor de água nos pulmões dos animais induzidos por OVA (OVA + SAL) (Figura 6J). Além disso, houve uma diminuição na quantidade de água no pulmão de camundongos asmáticos tratados com peptídeo (OVA + PF7) e fago (OVA + ff7) quando comparados com o grupo controle (OVA + SAL) (Figura 6J). Diferentemente, os não-asmáticos tratados com dexametasona (SAL + DEXA) diminuíram o teor de água nos pulmões em camundongos não-asmáticos, quando comparados com o grupo controle negativo (SAL) (Figura 6J).

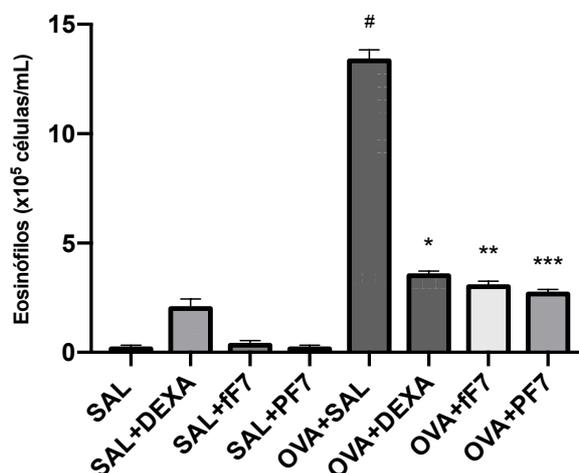


**Figura 6. Morfologia do tecido pulmonar e teor de água no pulmão.** Visão histológica do pulmão por não asmáticos (SAL; A); não asmáticos tratados com Dexametasona (SAL + DEXA; B); não asmáticos tratados com fago ff7 (SAL + ff7; C); não asmáticos tratados com peptídeo mimético PF7 inibidor de PLA2 (SAL + PF7; D); asmáticos (OVA + SAL; E); asmático tratado com Dexametasona (OVA + DEXA; F); asmáticos tratados com fago ff7 (OVA + ff7; G); asmáticos tratados com camundongos peptídeos miméticos PF7 (OVA + PF7; H) do inibidor de PLA2; Ampliação 40x. (I) Escore de inflamação peribrônquica; #P <0,0001 vs SAL; ## P <0,0001 vs SAL; \* P <0,0001 vs OVA + SAL; \*\* P <0,0001 vs OVA + SAL; \*\*\* P <0,0001 vs OVA + SAL. (J) A razão de peso úmido / seco foi obtida ao pesar o lobo do pulmão direito coletado no dia 25 do protocolo de indução de asma e pesado novamente após 24h no fogão a 37 ° C para estimar o conteúdo de água no pulmão. Sal vs SAL +

DEXA, #P <0,0001; SAL vs OVA + SAL, ## P <0,0001; OVA + fF7 vs OVA + SAL, \* P <0,0001; OVA + PF7 vs OVA + SAL, \*\* P <0,0001. Os dados são representativos de 4 a 7 animais por grupo. ANOVA unidirecional, pós-teste de Student-Newman-Keuls.

### 3.4 CONTAGEM DE EOSINÓFILOS NO BAL

Os dados apresentaram aumento significativo do nível eosinofílico no grupo controle (OVA + SAL) quando comparado ao grupo controle negativo (SAL) (Figura 7). Além disso, foi observada uma redução nos níveis de eosinófilos no BAL dos grupos de camundongos sensibilizados com OVA e que receberam tratamentos (OVA + DEXA, OVA + PF7 e OVA + fF7), quando comparados ao grupo controle positivo (OVA + SAL), caracterizando uma melhora na inflamação das vias aéreas dos animais tratados (Figura 7).

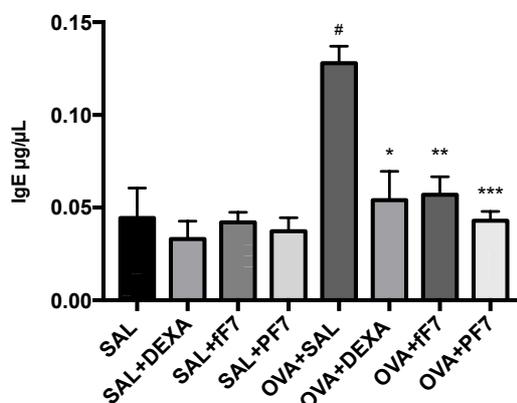


**Figura 7. Contagem de eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL).** SAL vs OVA + SAL, #P <0,0001; OVA + SAL vs OVA + DEXA, \* P <0,0001; OVA + SAL vs OVA + fF7, \*\* P <0,0001; OVA + SAL vs OVA + PF7, \*\*\* P <0,0001. ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de Student-Newman Keuls.

### 3.5 TÍTULOS DE ANTICORPOS IgE

Como o protocolo experimental foi iniciado com a sensibilização dos animais com ovalbumina, os níveis séricos de IgE foram medidos. Dessa forma, pode-se observar na Figura 8 um aumento nos níveis de IgE OVA-específica no soro dos camundongos do grupo controle positivo (OVA + SAL) quando comparados aos do grupo controle negativo (SAL). No entanto, os grupos de animais asmáticos que receberam tratamentos (OVA + DEXA, OVA + fF7 e

OVA + PF7) apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de IgE OVA-específico no soro, quando comparados ao grupo controle positivo (OVA + SAL) (Figura 8).



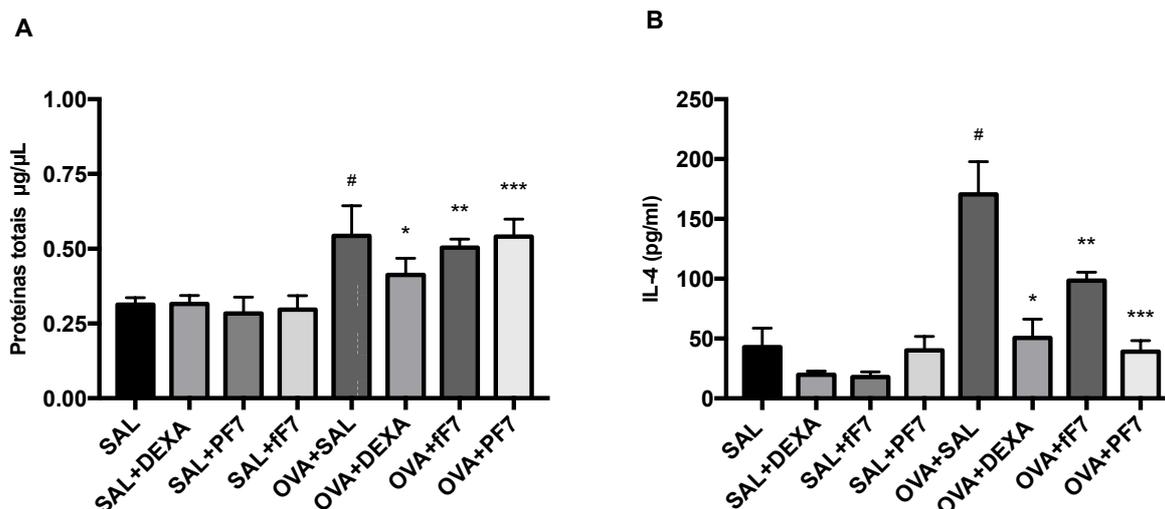
**Figura 8. Níveis de IgE OVA-específicos no soro.** Níveis de IgE OVA-específico no soro encontram-se aumentados no grupo controle positivo (OVA + SAL), quando comparados ao grupo controle negativo (SAL) (#P <0,0001. Os tratamentos com Dexametasona, PF7 e fF7 diminuíram significativamente o nível de IgE específicos de OVA em camundongos asmáticos (OVA + DEXA vs OVA + SAL, \* P <0,0001; OVA + fF7 vs OVA + SAL, \*\* P <0,0001; OVA + PF7 vs OVA + SAL, \*\*\* P <0,0001). ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de Student-Newman Keuls. Os dados representam duplicatas para tratamentos e controles.

### 3.6 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO BAL

A Figura 9 mostra a concentração total de proteínas medida no lavado broncoalveolar. Os grupos SAL, SAL + DEXA, SAL + fF7 e SAL + PF7 não apresentaram alteração na concentração total de proteínas do BAL dos animais, mas o grupo controle positivo (OVA + SAL) apresentou elevada concentração de proteínas quando comparados ao grupo controle negativo (SAL) (Figura 9A). Entretanto, os grupos: OVA + DEXA, OVA + fF7 e OVA + PF7, apresentaram níveis reduzidos de concentração total de proteínas quando comparados ao grupo controle positivo (OVA + SAL) (Figura 9A).

Além disso, camundongos asmáticos do grupo controle positivo (OVA + SAL) apresentaram níveis elevados de interleucina-4 (IL-4) no BAL, quando comparados ao grupo controle negativo (SAL), assim como os grupos de animais asmáticos tratados (OVA + DEXA, OVA + fF7 e OVA + PF7) (Figura 9B). Entretanto, quando comparados ao grupo controle positivo (OVA + SAL), os animais asmáticos tratados (OVA + DEXA, OVA + fF7 e OVA +

PF7) apresentaram diminuição dos níveis de IL-4 (Figura 9B). Contudo, quando compara-se o grupo controle negativo (SAL) com os demais, dos animais não-asmáticos que receberam tratamentos (SAL + DEXA, SAL + fF7 e SAL + PF7) somente o grupo SAL + PF7 apresentou níveis de IL-4 iguais aos do controle, os demais apresentaram níveis menores (SAL + DEXA, SAL + fF7) (Figura 9B).

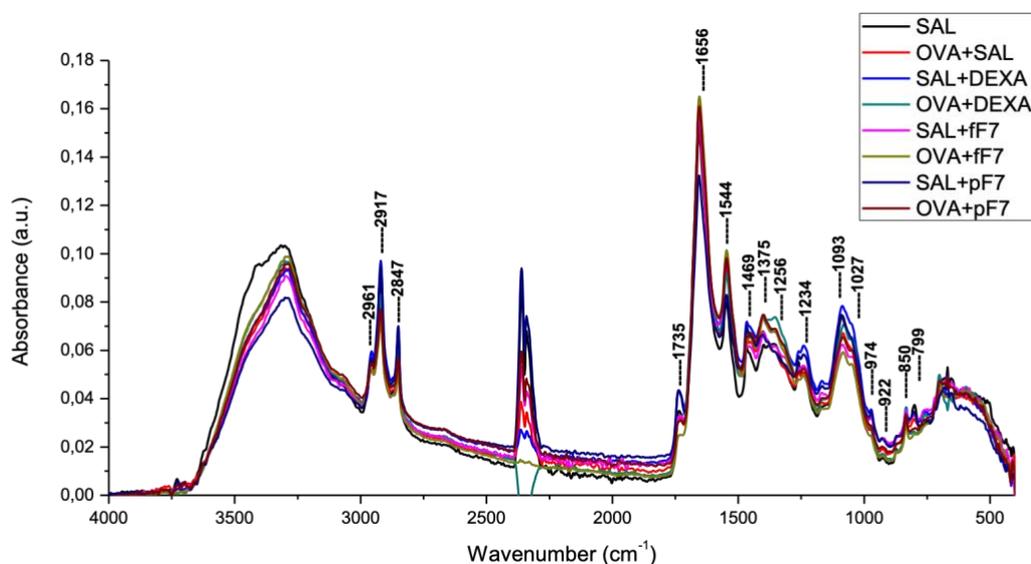


**Figura 9. Concentração total de proteínas e citocinas inflamatórias no lavado broncoalveolar.** (A) concentração total de proteínas; OVA + SAL vs SAL, #P <0,0001; OVA + DEXA vs OVA + SAL, \* P <0,0001; OVA + fF7 vs OVA + SAL, \*\* P <0,0001; OVA + PF7 vs OVA + SAL, \*\*\* P <0,0001. (B) Interleucina-4 (OVA + SAL vs SAL, #P <0,0001; OVA + DEXA vs OVA + SAL, \* P <0,0001; OVA + fF7 vs OVA + SAL, \*\* P <0,0001; OVA + PF7 vs OVA + SAL, \*\*\* P <0,0001). Os resultados são média ± SEM de 5-6 animais. ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de Student-Newman Keuls.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES PULMONARES USANDO ATR-FTIR

A análise do espectro obtido a partir do ATR-FTIR em amostras de BAL, contendo diferentes moléculas como lipídios, proteínas, glicoproteínas e ácido nucleico, está representada na Figura 10. Esses espectros indicaram várias diferenças entre os grupos de camundongos asmáticos e não asmáticos, em torno de 2961 cm<sup>-1</sup>. a 799 cm<sup>-1</sup>. Os demais valores apresentados no gráfico se encontram no material suplementar. A análise dessas bandas revelou que essas regiões indicam a presença de amida, um composto orgânico que pode ser derivado da liberação de radicais livres pelo organismo. Em camundongos asmáticos tratados com

peptídeo (OVA + PF7), a concentração de amida I e II diminuiu quando comparada aos níveis de absorvância no grupo controle positivo (OVA + SAL) (Figura 10).



**Figura 10. Determinação de biomarcadores pulmonares usando espectroscopia ATR-FTIR.** Bandas espectrais: 2961 $\text{cm}^{-1}$ =  $\nu_{\text{as}}$   $\text{CH}_3$ , 2917  $\text{cm}^{-1}$ = alongamento C-H, 2847  $\text{cm}^{-1}$ = alongamento simétrico de metoxi, 1735  $\text{cm}^{-1}$ = alongamento C=O (lipídios), 1656  $\text{cm}^{-1}$ = Amida I / C=O citosina, 1544  $\text{cm}^{-1}$ = Amida II (surge do alongamento CN e vibrações de flexão de CHN), 1469  $\text{cm}^{-1}$ = flexão de  $\text{CH}_2$  das cadeias acila dos lipídios / vibração de corte  $\text{CH}_2$  das cadeias acila (fosfolipídios), 1375  $\text{cm}^{-1}$ = Alongamento de citosina CN, guanina, 1234 $\text{cm}^{-1}$ = Composto de amida III e vibração de fosfato de ácidos nucleicos /  $\text{CH}_6,2 \alpha, \alpha$  rock, 1093  $\text{cm}^{-1}$ = Alongamento  $\text{PO}_2^-$  2 simétrico (fosfato II),  $\nu_{\text{asym}}$  (C-O-C) (polissacarídeos-celulose), 974  $\text{cm}^{-1}$ =OCH<sub>3</sub> (polissacarídeos, pectina), 922  $\text{cm}^{-1}$ = região das faixas de alongamento do fosfodiéster (para absorvâncias devido ao colágeno e glicogênio), 850  $\text{cm}^{-1}$ = DNA de hélice esquerda (forma Z), 799  $\text{cm}^{-1}$ = vibrações de flexão fora do plano.

#### 4. DISCUSSÃO

Recentemente, muita atenção tem se voltado aos peptídeos, que são moléculas capazes de mimetizar a função de mediadores envolvidos em doenças relacionadas à inflamação. Tendo isso como base, um modelo experimental murino foi desenvolvido neste estudo para investigar seus efeitos terapêuticos no tratamento da asma alérgica. As alterações fisiológicas e imunomoduladoras de um peptídeo mimético ao inibidor de  $\text{PLA}_2$  (PF7) foram observadas em animais asmáticos induzidos por ovalbumina.

Camundongos Balb/C sensibilizados e desafiados por ovalbumina apresentaram infiltração pulmonar acentuada de eosinófilos. A modulação da resposta imune parece ser a principal função dessas células, recrutadas na asma alérgica, e o tratamento com peptídeo (PF7)

apresentou dados que indicaram uma redução no infiltrado inflamatório e, conseqüentemente, no número de eosinófilos, caracterizando sua importância na doença, atuando como células efetoras no processo inflamatório (Shifren *et al.*, 2012; Trivedi *et al.*, 2007).

Os parâmetros eletrofisiológicos respiratórios, demonstrados através da análise da função respiratória e medidos pela espirometria, tem sido um dos principais meios de avaliar os sintomas da asma em pacientes (Rosi *et al.*, 1999). Com base nisso, analisando os resultados obtidos nos animais, o volume corrente indicou maior quantidade de ar circulante após o tratamento com peptídeo (PF7); a frequência respiratória também foi menor nos animais asmáticos tratados com PF7, o que indica que o animal conseguiu respirar sem esforço, diferente dos animais asmáticos que não receberam tratamento e que apresentaram frequência respiratória elevada; o volume minuto indicou maior fluxo de ar nos pulmões por minuto após o tratamento com PF7. Portanto, os dados sugerem uma melhora da função respiratória, pois há maior quantidade de ar circulando pelos pulmões e menor quantidade de ar ficando retida nos alvéolos (Rana *et al.*, 2016).

Na análise de danos histológicos observou-se inflamação brônquica e danos nas vias aéreas dos pulmões dos animais asmáticos, o que consiste com as alterações morfológicas esperadas nos animais asmáticos. Contudo, notamos um aumento na relação entre peso úmido/peso seco, indicando maior quantidade de água presente nos pulmões dos camundongos asmáticos tratados com solução salina (grupo controle positivo). Histologicamente, isso pode estar associado à agregação de células inflamatórias no tecido alveolar, mediadas por receptores específicos (Matsuyama *et al.*, 2008). Quando tratados com o peptídeo (PF7), os camundongos asmáticos apresentaram uma diminuição na quantidade de água presente nos pulmões, indicando atenuação das alterações do tecido pulmonar.

Como esperado, os níveis de IgE sérico específicos para ovalbumina refletem a extensão da sensibilização nos animais asmáticos, nos quais apresentaram-se elevados, mas que foram reduzidos nos animais asmáticos tratados com o peptídeo (PF7). Esses resultados corroboram com outros estudos, que afirmam que indivíduos com níveis de IgE elevados tem maior predisposição a sofrerem de asma ou a serem diagnosticados com asma no futuro (Burrows *et al.*, 1989; Tollerud *et al.*, 1991; Beeh *et al.*, 2000). Além disso, a produção de anticorpos IgE em indivíduos asmáticos depende de uma série de interações entre células B e T, mastócitos e eosinófilos, bem como o envolvimento de citocinas, tal como IL-4, nas paredes das vias aéreas e isso explica a elevação dos níveis de IgE específico no soro dos animais asmáticos, demonstrada nos resultados, e o porque deste anticorpo atuar como um biomarcador da doença (Djukanovic *et al.*, 1990; Razi *et al.*, 2010).

Outros estudos mostraram que as citocinas de perfil Th2 atuam como mediadores críticos da inflamação alérgica (Steinke *et al.*, 2001; Slager *et al.*, 2012), o que corrobora com os dados apresentados neste trabalho, os quais demonstraram níveis elevados de interleucina-4 (IL-4) no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais asmáticos tratados com solução salina e que diminuíram após o tratamento com peptídeo mimético ao inibidor de PLA<sub>2</sub> (PF7). Sabe-se que essa citocina é um dos principais efetores nas respostas dependentes de Th2 e que está crucialmente envolvida na infiltração local de eosinófilos, incluindo a estimulação da síntese de IgE (Tachdjian *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2001).

A inflamação é a característica mais comum em várias doenças pulmonares e pode causar alterações na composição bioquímica do organismo, afetando a presença de metabólitos no trato respiratório (Qamar *et al.*, 2014). Dessa forma, técnicas espectroscópicas vibracionais, incluindo espectroscopia ATR-FTIR, podem ser aplicadas na análise de amostras biológicas para fornecer informações sobre sua composição bioquímica, como por exemplo seus grupos funcionais e apoiar investigações clínicas relacionadas à detecção de biomarcadores em doenças como a asma (Ami *et al.*, 2012; Talari *et al.*, 2017). Neste trabalho, encontramos em amostras de BAL a presença de compostos como amida I e II e sua ocorrência tem sido associada ao estresse oxidativo e aumento de enzimas de defesa antioxidantes, que participam na ativação ou restauração do equilíbrio entre oxidação e antioxidação, e que pode resultar do processo inflamatório e da produção de eosinófilos (Comhair *et al.*, 2010; Erzurum *et al.*, 2016).

Considerando que a inibição da PLA<sub>2</sub> é capaz de reduzir reações inflamatórias, frequentes em indivíduos asmáticos e que os mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam essa condição ainda estão sendo estudados, é essencial o desenvolvimento de modelos experimentais para conhecer o funcionamento dessas vias em doenças respiratórias, avaliar a ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> neste sistema e os mecanismos que provocam reações inflamatórias, visando o desenvolvimento de novos tratamentos para a asma.

## 5. CONCLUSÕES

Em resumo, no presente estudo mostramos que a administração do peptídeo mimético ao inibidor da PLA<sub>2</sub> atenuou muitas características patogênicas importantes da asma alérgica induzida pela ovalbumina, incluindo inflamação das vias aéreas e níveis de IgE específicos a OVA. Esses resultados indicam que peptídeos, como o PF7, podem ser utilizados como estratégias terapêuticas eficazes no tratamento de pacientes asmáticos, aliviando os sintomas da doença e melhorando o fluxo de ar nos pulmões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H.; Andrew H., *et al.* **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, 20: 953-97.

Akuthota, P.; Xenakis, J. J.; Weller, P. F. Eosinophils: Offenders or general bystanders in allergic airway disease and pulmonary immunity? **Journal of Innate Immunity**. 2011, 3: 113-119. <https://doi.org/10.1159/000323433>

Ami, D.; Natalello, A.; Doglia, S. M. Fourier transform infrared microspectroscopy of complex biological systems: From intact cells to whole organisms. **In: Uversky V., Dunker A. (eds) Intrinsically Disordered Protein Analysis**. Methods in Molecular Biology. 2012, 895: 85-100. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-927-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-927-3_7)

Aun, M. V.; Bonamichi-Santos, R.; Magalhães, F., *et al.* Animal models of asthma: utility and limitations. **Journal of Asthma and Allergy**. 2017, 10: 293-301. <https://doi.org/10.2147/JAA.S121092>

Barreto, S. S. M.; Cavalazzi, A. C. Determinação dos volumes Pulmonares. Métodos de mensuração dos volumes pulmonares. **Jornal de Pneumologia**. 2002, 28(Supl 3): S95-S100.

Bayes, H. K.; Cowan, D. C. Biomarkers and asthma management: an update. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**. 2016, 16 (3): 210–17, <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000263>

Beeh, K. M.; Ksoll, M.; Buhl, R. Elevation of total serum immunoglobulin E is associated with asthma in nonallergic individuals. **European Respiratory Journal**. 2000, 16 (4): 609-14. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.16d07.x>

Bratkovic, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2010, 67 (5): 749-67. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0192-2>

Brigham, E. P.; West, N. E. Diagnosis of asthma: diagnostic testing. **International Forum of Allergy & Rhinology**. 2015, 5 (Suppl 1): 27–30. <https://doi.org/10.1002/alr.21597>  
Comhair, S. A. A.; Erzurum, S. C. Redox control of asthma: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **In: Antioxidants and Redox Signaling**. 2010, 12 (1): <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2425>

Burrows, B.; Martinez, F. D.; Halonen, M., *et al.* Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. **The New England Journal of Medicine**. 1989, 320 (5): 271-77. <https://doi.org/10.1056/NEJM198902023200502>

Conrad, M. L.; Yildirim, A. Ö.; Sonar, S. S., *et al.* Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clinical and Experimental Allergy**. 2009, 39: 1246-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03260.x>

Dubinin, M. V.; Astashev, M.E.; Penkov, N. V., *et al.* Effects of Phospholipase A2 Inhibitors on Bilayer Lipid Membranes. **The Journal of Membrane Biology**. 2016; 249 (3): 339–47. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9872-7>

Djukanović, R.; Roche, W. R.; Wilson, J. W., *et al.* Mucosal inflammation in asthma. **American Review of Respiratory Disease**. 1990, 142 (2): 434-57. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/142.2.434>

Erzurum, S. C. New insights in oxidant biology in asthma. **In: Annals of the American Thoracic Society**. 2016, 13 (Supl 1): S35-39. doi: [10.1513/AnnalsATS.201506-385MG](https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201506-385MG)  
Ferguson, J. E.; Patel, S. S.; Lockey, R. F. Acute asthma, prognosis, and treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2017, 132 (2): 438- 47. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.054>

Gimenes, S. N. C.; Ferreira, F. B.; Silveira, A. C. P., *et al.* Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**. 2014, 81: 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.01.012>

Gimenes, S. N. C.; Lopes, D. S.; Alves, P. T. Antitumoral effects of  $\gamma$ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Scientific Reports**. 2017, 7: 7077. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07082-2>

Global Asthma Network. **The Global Asthma Report 2018**. Auckland, New Zealand. 2018. Disponível em: [www.globalasthmareport.org](http://www.globalasthmareport.org) Acesso em: Novembro de 2019.

Global Initiative for Asthma (GINA). **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**. 2019. Disponível em: [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org) Acesso em: Novembro de 2019.

Goyal, R.; Ramakrishnan, V. Peptide-Based Drug Delivery Systems. **In: Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery**. 2019, 25-45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00002-7>

Hurley, B. P.; McCormick, B. Multiple roles of phospholipase A2 during lung infection and inflammation. **Infection and Immunity**. 2008, 76 (6): 2259-72. <https://doi.org/10.1128/IAI.00059-08>

Inoue, S.; Kogaki, H.; Ikeda, K., *et al.* Amino Acid Sequences of the Two Subunits of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Blood Plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. **Journal of Biological Chemistry**. 1991, 266 (2): 1001-7.

Jacobsen, E. A.; Lee, N. A.; Lee, J. J. Re-defining the unique roles for eosinophils in allergic respiratory inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**. 2014, 44 (9): 119-36. <https://doi.org/10.1111/cea.12358>

Kitamura, Y.; Hashimoto, S.; Mizuta, N.; *et al.* Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2001, 163: 762–69. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.3.2003065>

- Kool, M.; Soullié, T.; van Nimwegen, M., *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**. 2008, 205 (4): 869-882. <https://doi.org/10.1084/jem.20071087>
- Kung, T. T.; Jones, H.; Adams, G. K., *et al.* Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. **International Archives of Allergy and Immunology**. 1994, 105 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1159/000236807>
- Matsuyama, H.; Amaya, F.; Hashimoto, S., *et al.* Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: An experimental study. **Respiratory Research**. 2008, 9: 79. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-9-79>
- Moldaver, D.; Larché, M. Immunotherapy with peptides. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2011, 66 (6): 784-91. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02610.x>
- Molek, P.; Strukelj, B.; Bratkovic, T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: Targeting membrane receptors. **Molecules**. 2011, 16 (1): 857-87. <https://doi.org/10.3390/molecules16010857>
- Mruwat, R.; Yedgar, S.; Lavon, I., *et al.* Phospholipase A2 in experimental allergic bronchitis: A lesson from mouse and rat models. **PLoS One**. 2013; 8(10): e76641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076641>
- Murakami, M.; Taketomi, Y.; Miki, Y., *et al.* Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: The 3rd edition. **Biochimie**. 2014; 107: 105–13. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.003>
- Possa, S.S.; Leick, E. A.; Prado, C. M., *et al.* Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers Pharmacology**. 2013, 4:46. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00046>
- Qamar, W.; Ahamad, S. R.; Ali, R., *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**. 2014, 40 (9): 460–66. <https://doi.org/10.3109/01902148.2014.947008>
- Rana, S.; Shahzad, M.; Shabbir, A. Pistacia integerrima ameliorates airway inflammation by attenuation of TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-5 expression levels, and pulmonary edema by elevation of AQP1 and AQP5 expression levels in mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma. **Phytomedicine**. 2016, 23 (8): 838-45. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.04.006>
- Razi, E.; Moosavi, G. A. Relação dos níveis séricos de IgE total e das contagens de eosinófilos com a resposta ao tratamento em pacientes com asma aguda. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2010, 36 (1): 23–28. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132010000100006>
- Rosi, E.; Ronchi, M. C.; Grazzini, M.; Duranti, R.; Scano, G. Sputum analysis, bronchial hyperresponsiveness and airway function in asthma: Results of a factor analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 1999, 103 (2): 232-37. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70496-3](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70496-3)

Shifren, A.; Witt, C.; Christie, C.; Castro, M. Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways. **Journal of Allergy**. 2012, 2012: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/316049>

Shoseyov, D.; Bibi, H.; Offer, S., et al. Treatment of ovalbumin-induced experimental allergic bronchitis in rats by inhaled inhibitor of secretory phospholipase A2. **Thorax**. 2005, 60 (9): 747-53. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.043695>

Slager, R. E.; Otulana, B. A.; Hawkins, G. A., et al. IL-4 receptor polymorphisms predict reduction in asthma exacerbations during response to an anti-IL-4 receptor  $\alpha$  antagonist. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 2012, 120 (2): 516-22. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.030>

Steinke, J. W.; Borish, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respiratory Research**. 2001, 2 (2): 66-70. <https://doi.org/10.1186/rr40>

Tachdjian, R.; Mathias, C.; Khatib, S. Al., et al. Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma. **Journal of Experimental Medicine**. 2009, 206 (10): 2191. <https://doi.org/10.1084/jem.20091480>

Tagaya, E.; Tamaoki, J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. **Allergology International**. 2007, 56 (4): 331-40. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-07-152>

Talari, A. C. S.; Martinez, M. A. G.; Movasaghi, Z., et al. Advances in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**. 2017, 52: 456-506. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1230863>

To, T.; Stanojevic, S.; Moores, G. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**. 2012, 12: 204. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-204>

Tollerud, D. J.; O'Connor, G. T.; Sparrow, D., et al. Asthma, hay fever, and phlegm production associated with distinct patterns of allergy skin test reactivity, eosinophilia, and serum IgE levels. **American Review of Respiratory Disease**. 1991, 144 (4): 776-81. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.4.776>

Trivedi, S. G.; Lloyd, C. M. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2007, 64: 1269. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6527-y>

Vodnik, M.; Zager, U.; Strukelj, B., et al. Phage display: Selecting straws instead of a needle from a haystack. **Molecules**. 2011, 16 (1): 790–817. <https://doi.org/10.3390/molecules16010790>

Weissler, J. C. Eosinophilic Lung Disease. **The American Journal of the Medical Sciences**. 2017, 354 (4): 339-49. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2017.03.020>

Wong, C. K.; Ho, C. Y.; Ko, F. W. S., et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma.

**Clinical and Experimental Immunology.** 2001, 125 (2): 177–83.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01602.x>



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Análise fisiológica dos efeitos de peptídeos miméticos inibidores de PLA2 em modelo experimental murino de asma alérgica”, protocolo nº 103/18, sob a responsabilidade de **Luiz Ricardo Goulart Filho** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **26 de Abril de 2019**.

(We certify that the project entitled “Análise fisiológica dos efeitos de peptídeos miméticos inibidores de PLA2 em modelo experimental murino de asma alérgica”, protocol 103/18, under the responsibility of Luiz Ricardo Goulart Filho - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of April 26th, 2019).

|   |  |
|---|--|
| Vigência do Projeto                     | Início: 20/05/2019 Término: 22/05/2024                               |
| Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos | Camundongo isogênico BALB/c  |
| Número de animais                       | 180  |
| Peso / Idade                            | 20 - 45g/ 4 - 8 semanas  |
| Sexo                                    | Macho  |
| Origem / Local                          | Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU) |
| Local onde serão mantidos os animais:   | Biotério Central da REBIR  |

Uberlândia, 14 de Maio de 2019.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**

Coordenador da CEUA

SEI Nº 1201, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2018