

ARTIGO ORIGINAL

Modulação da expressão da sintase induzível de óxido nítrico pelo glicocorticóide inalado na asma brônquica

Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by inhaled corticosteroid in bronchial asthma

Eduardo Costa¹, Mário Ribeiro², Luiz Bandeira³, Marcelo Kalichstein⁴, Alexandre Cardoso⁵, Patrícia Lago⁶, Vera Baptista⁷, Alfeu França⁸, José Roberto Lapa e Silva⁹

Resumo

Introdução: O óxido nítrico (NO) e seus derivados têm papel importante como agentes pró-inflamatórios na asma, e os glicocorticóides têm ação inibitória sobre a sintase induzível de NO (NOS2). Não está claro se esse efeito terapêutico sobre a produção de NO é relevante para a eficácia clínica da corticoterapia tópica na asma.

Objetivos: Observar o efeito do glicocorticóide inalado sobre a expressão da NOS2 pelas células da via aérea inferior de asmáticos pelo escarro induzido, e correlacioná-la com índices clínicos e funcionais de atividade e gravidade da doença.

Métodos: Foram incluídos 18 asmáticos adultos, não fumantes, sem infecção respiratória e sem uso recente de glicocorticóides. A avaliação clínica-funcional, e a coleta de escarro foram feitas antes e após 30 e 90 dias de uso contínuo de 1000 mcg de beclometasona *spray*. A contagem diferencial de células no escarro foi feita após coloração de May-Grumwald-Giemsa. O estudo imunocitoquímico utilizou o anticorpo NO53 (anti-NOS2) e a coloração pelo método APAAP. A densidade óptica das colorações foi medida utilizando-se o programa *Image Pro Plus*. ANOVA e o teste de Bonferroni foram utilizados para a comparação das contagens celulares e densidades ópticas das colorações. Consideramos o nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados: A expressão da NOS2 diminuiu significativamente durante o tratamento ($p < 0,003$), de forma paralela à redução do percentual de eosinófilos e de células epiteliais no escarro ($p = 0,0002$ e $p = 0,009$, respectivamente). O volume expiratório forçado em um segundo aumentou durante o tratamento ($p = 0,01$). Os pacientes com asma moderada e grave tiveram ex-

Abstract

Introduction: In recent years many publications suggested that nitric oxide and its derivatives are important in asthmatic inflammation. It is unclear if the clinical efficacy of inhaled corticosteroid therapy is related to its inhibitory effect on inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression.

Objective: To observe the effect of inhaled corticosteroid on expression by airway cells in induced sputum of asthmatics, and to correlate it with functional and clinical parameters of disease activity and severity.

Methods: Eighteen adults with bronchial asthma, non-smokers in last year, non-pregnant, without respiratory infection or recent use of glucocorticosteroids had been enrolled. Clinical and functional assessment, and sputum induction were made before and after 30 and 90 days of treatment with beclomethasone dipropionate (BDP). Differential cell counting was obtained after May-Grumwald-Giemsa staining. Immunocytochemical staining with NO53 anti-NOS2 antibody and APAAP was followed by image analysis using *Image Pro Plus* software. ANOVA and Bonferroni's test were used to compare cell counts and optical densities of immunocytochemical stains. Significance was taken at $p < 0.05$.

Results: NOS2 expression decreased significantly in sputum cells during treatment ($p = 0.003$), in parallel with reduction of eosinophil and epithelial cell counts ($p = 0.0002$ and $p = 0.009$, respectively). Forced expiratory volume in one second increased during treatment ($p = 0.01$). Patients with moderate and severe asthma had greater NOS 2 expression before and during treatment when compared with patients with

pressão maior da NOS2 antes e durante o tratamento em comparação aos asmáticos leves ($p=0,01$). Houve correlação significativa entre o percentual de eosinófilos no escarro e a expressão da NOS2 antes do início da corticoterapia ($r= - 0,50 / p=0,03$).

Conclusões: A terapia anti-inflamatória resultou em redução da inflamação eosinofílica e da descamação epitelial na via aérea. A expressão da NOS2 nas células obtidas pelo escarro induzido diminuiu durante o tratamento com glicocorticóide. Este é mais um aspecto relevante do efeito anti-inflamatório da corticoterapia e do monitoramento do processo inflamatório na asma.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004;27(1):19-29
asma, escarro induzido, óxido nítrico, glicocorticóide

1 - Mestre em Medicina/Imunologia – pela UFRJ e Chefe do Setor de Alergia e Imunologia do HUPE/FCM – UERJ; 2 – Biólogo responsável pelo Laboratório de Histomorfometria – FCM – UERJ; 3 – Mestre em Medicina / Imunologia – pela UFRJ; 4 – Mestre em Medicina/Pneumologia – pela UFRJ; 5 – Professor Adjunto – Pneumologia – FM – UFRJ; 6 – Bióloga do HUCFF – UFRJ; 7 – Biomédica do HUCFF – UFRJ; 8 – Professor Titular – Imunologia Clínica – FM – UFRJ; 9 – Professor Titular – Pneumologia – FM – UFRJ

Introdução

A asma brônquica é definida pela presença de broncoespasmo reversível, inflamação crônica das vias aéreas e hiperresponsividade brônquica para vários estímulos, e é considerada um problema de saúde pública mundial¹. São reconhecidas várias células e moléculas importantes no início e perpetuação do processo inflamatório brônquico na asma. Nos últimos anos vários estudos demonstraram que o óxido nítrico (NO) e seus derivados são fatores importantes no controle do tônus vascular e brônquico²⁻⁴, e também em mecanismos de ativação celular e dano tecidual potencialmente operantes na inflamação asmática^{4,5}, particularmente quando a isoforma induzível da sintase de óxido nítrico (NOS2) está envolvida.

O objetivo do estudo foi observar o efeito do glicocorticóide inalado sobre a expressão da NOS2 em células da via aérea pelo escarro induzido, e correlacionar esta expressão com parâmetros clínicos e funcionais de gravidade da doença antes e durante o tratamento anti-inflamatório em contexto ambulatorial.

Pacientes e métodos

Este foi um estudo longitudinal de uma série de

mild asthma ($p=0,01$). There was significant correlation between eosinophil counts and NOS 2 expression before treatment ($r= - 0,50 / p=0,03$).

Conclusions: Anti-inflammatory therapy resulted in significant reduction of eosinophilic inflammation and epithelial cell desquamation. NOS2 expression in airway cells was reduced and this effect persisted during treatment. This can be one more relevant aspect of anti-inflammatory treatment of asthma.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004;27(1):19-29
asthma, induced sputum, nitric oxide, glucocorticoid

pacientes com asma brônquica em acompanhamento ambulatorial, os quais receberam tratamento anti-inflamatório tópico e foram avaliados durante 90 dias. Foram alocados 28 adultos com asma brônquica (critérios da ATS 1987). Foram excluídos as mulheres grávidas e aqueles com história de tabagismo no último ano, ou infecção respiratória no último mês, ou ainda os que utilizaram glicocorticóides tópicos ou sistêmicos nos últimos 90 dias. Todos foram informados dos objetivos e métodos do estudo e assinaram termo de consentimento. Os pacientes foram alocados nos ambulatórios dos Serviços de Imunologia e Pneumologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) – UFRJ. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local.

Foram feitas avaliações clínicas (anamnese, exame físico, teste cutâneo com alérgenos inalantes (IPI ASAC do Brasil), funcionais (espirometria com prova broncodilatadora seguida de prova broncoconstrictora se necessário – Sistema de análise de função pulmonar Warren & Collins Inc. – MA/USA), e indução de escarro por nebulização com solução salina hipertônica antes e após 30 e 90 dias de tratamento. Os pacientes receberam 500 mcg de dipropionato de beclometasona (DPB) (Clenil Forte Jet spray® – Farmlab-Chiesi – SP/Brasil) duas vezes por dia durante esse período. Foi feito controle do uso do medicamento pela pesagem dos frascos ao final de cada período de 30 dias, quando era fornecido novo frasco da medicação.

A indução do escarro foi realizada como descrito por Pin *et al*⁶. Quinze minutos após administração de 200 mcg de salbutamol inalado com

espaçador (Aerolin *spray*[®] – Glaxo-Wellcome – UK), era iniciada a nebulização ultrassônica com solução salina hipertônica (Nebulizador Pulmo-clear I – Soniclear – SP/Brasil), o qual produz fluxo de 6 litros por minuto, sendo 80% das partículas com diâmetro inferior a 3 µm.

Utilizamos três períodos sucessivos de sete minutos até um total de 21 minutos de nebulização, com incrementos progressivos da concentração da solução salina nebulizada (2%, 3% e 4%). O pico de fluxo expiratório (PFE) foi registrado antes e após cada período de nebulização (medidor Mini-Wright – Clement-Clarke International – UK). Se o PFE caísse mais que 20 % do valor inicial (pós-broncodilatador), a concentração de solução salina não era aumentada. Se o PFE caísse mais que 30 % do valor inicial, ou se qualquer sinal ou sintoma de obstrução brônquica (tosse persistente, dispnéia, opressão torácica ou sibilância) ocorresse, o procedimento era interrompido. Após cada período de sete minutos de nebulização, os pacientes enxaguavam cuidadosamente a orofaringe e eram estimulados a tossir para a expectoração e coleta do escarro.

As amostras de escarro foram processadas imediatamente após a coleta como previamente descrito⁶. A amostra total de escarro era tratada com DTT (Sigma Corporation – MO/USA) em banho maria por 20 minutos e então centrifugada a 40G, e o sobrenadante coletado para estocagem em *freezer*. O *pellet* celular era então re-suspenso em PBS estéril e lavado duas vezes. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante *trypan blue* (Sigma Corporation – MO/USA). Os cito-centrifugados foram fixados com clorofórmio-acetona e congelados a – 20° C. A contagem diferencial de células foi feita após coloração de *May-Grumwald-Giemsa*, e, pelo menos, 400 células não escamosas foram contadas por lâmina.

A coloração imunocitoquímica para a NOS2 foi feita por método imunoenzimático de fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (APAAP) com o *kit* Vectastain ABC-AP (AK 5001, Vector Laboratories Inc. – Burlingame/USA), usando o anticorpo NO53 como marcador. O anticorpo foi desenvolvido em coelhos usando um peptídeo sintético com a sequência idêntica aos sete amino-ácidos carboxi-terminais da NOS2 humana⁷. Os citocentrifugados congelados foram reaquesci-

dos em temperatura ambiente e incubados com soro de ovelha diluído em TBS, e então novamente incubados com solução diluída do anticorpo NO53 (1:500 em TBS) durante uma hora. Em seguida foi adicionado anticorpo anti-IgG de coelho (incubação por mais 30 minutos), seguido do complexo avidina-biotina-fosfatase alcalina (ABC-AP) por mais 30 minutos adicionais. A solução do substrato foi preparada com Tris-HCl (ph 9,0) mais o cromógeno *fast red* (Sigma Corp.). Uma coloração de controle foi feita para todas as lâminas utilizando o peptídeo bloqueador NO54 antes da adição do anticorpo NO53. O peptídeo bloqueador tem a mesma sequência de aminoácidos que o peptídeo que originou o anticorpo NO53, sendo reconhecido e fixado por ele⁷. Todos os procedimentos de coloração foram feitos na mesma ocasião.

A intensidade das colorações foi quantificada em sistema de imagens utilizando o programa *Image Pro Plus 3.1.2* (Media Cybernetics Corporation – Maryland/USA). Usamos a relação entre o vermelho, o verde e o azul (RGB) na análise de intensidade de cor, usando sempre os mesmos parâmetros de calibração do sistema óptico em todas as análises. O programa quantifica a intensidade de cor transformando-a em uma graduação numérica inversa de densidades ópticas, onde maiores densidades significam menor coloração. Este método foi utilizado com o mesmo propósito em outros estudos já publicados^{8,9}. Essa etapa do trabalho foi realizada no laboratório de histomorfometria do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas – UERJ.

Utilizamos ANOVA para medidas repetidas e o teste múltiplo de Bonferroni para comparar as contagens de células no escarro e as densidades ópticas das colorações antes e durante o tratamento. Foi utilizada regressão linear para correlacionar as densidades ópticas e as contagens celulares nos três tempos de observação do estudo. Utilizamos o programa *Graphpad Prism 2.0* (Graphpad Software – USA) na análise estatística e confecção dos gráficos correspondentes, e a significância estatística foi considerada quando o valor de $p < 0,05$.

Resultados

Dos 28 pacientes alocados, dez foram excluídos durante o estudo: três por fornecerem amos-

tras de escarro insuficientes, cinco por não terem retornado para reavaliação e coleta de escarro, uma paciente ficou grávida durante o estudo, e outro não usava corretamente o medicamento inalado.

As características gerais dos 18 pacientes que completaram o estudo estão descritas na tabela 1. A média de volume expiratório forçado no 1º segundo (VEF₁) aumentou, alcançando significância estatística apenas aos 90 dias de tratamento (p=0,01) (figura 1).

A redução do percentual de eosinófilos no escarro foi altamente significativa (p=0,0002), e o percentual de células epiteliais descamadas também diminuiu durante o tratamento (p=0,009). Ambas as mudanças alcançaram significância estatística já aos 30 dias de tratamento (figuras 2 e 3). O percentual de macrófagos aumentou (p=0,03) (figura 4), enquanto os percentuais de linfócitos e neutrófilos não mudaram durante o tratamento (p=0,51 e p=0,60, respectivamente).

Tabela 1 – Características gerais

| Características gerais | | | |
|--------------------------|------------------|----|------|
| | | Nº | % |
| Gênero | Masculino | 05 | 27,8 |
| | Feminino | 13 | 72,2 |
| Raça | Branca | 11 | 61,1 |
| | Negra | 07 | 38,9 |
| Idade (anos) | 18-40 | 10 | 55,5 |
| | 41-60 | 08 | 44,5 |
| Duração da asma | < 20 | 09 | 50,0 |
| | = 20 | 09 | 50,0 |
| Teste cutâneo | Positivo | 14 | 77,8 |
| | Negativo | 03 | 16,6 |
| | DND* | 01 | 5,6 |
| IgE total | > 100 UI/ml | 12 | 66,6 |
| | = 100 UI/ml | 05 | 27,8 |
| | DND* | 01 | 5,6 |
| VEF ₁ inicial | > 80% | 11 | 61,1 |
| | 60-80% | 04 | 22,2 |
| | < 60% | 03 | 16,7 |
| Gravidade (GINA) | Intermitente | 03 | 16,7 |
| | Persistente leve | 04 | 22,2 |
| | Moderada | 08 | 44,4 |
| | Grave | 03 | 16,7 |

* DND – dado não disponível

Figura 1 – Evolução do volume expiratório forçado no primeiro segundo durante o tratamento; (*) momento de alteração significativa

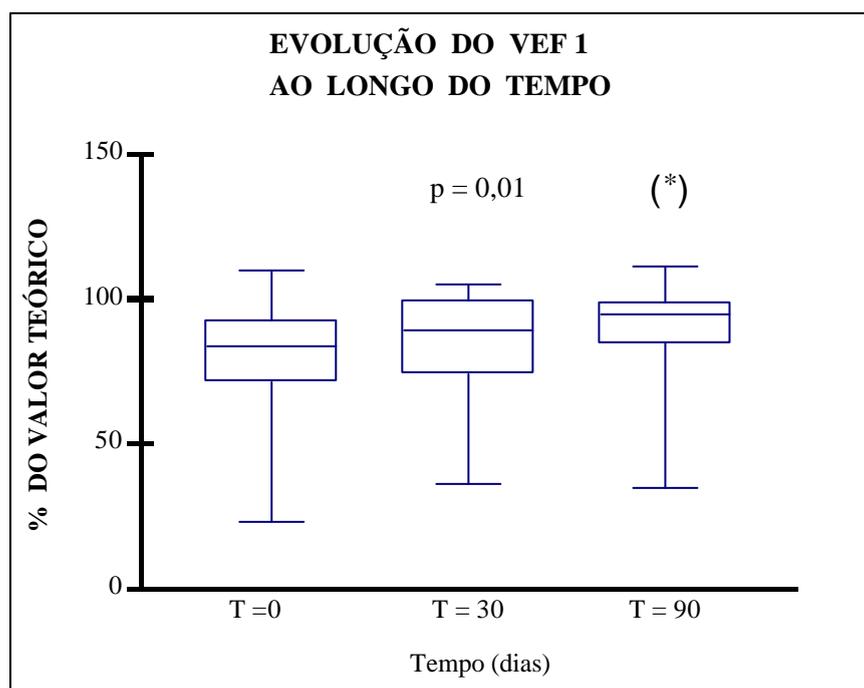


Figura 2 – Percentual de eosinófilos nas amostras de escarro ao longo do tempo; (*) momento de alteração significativa

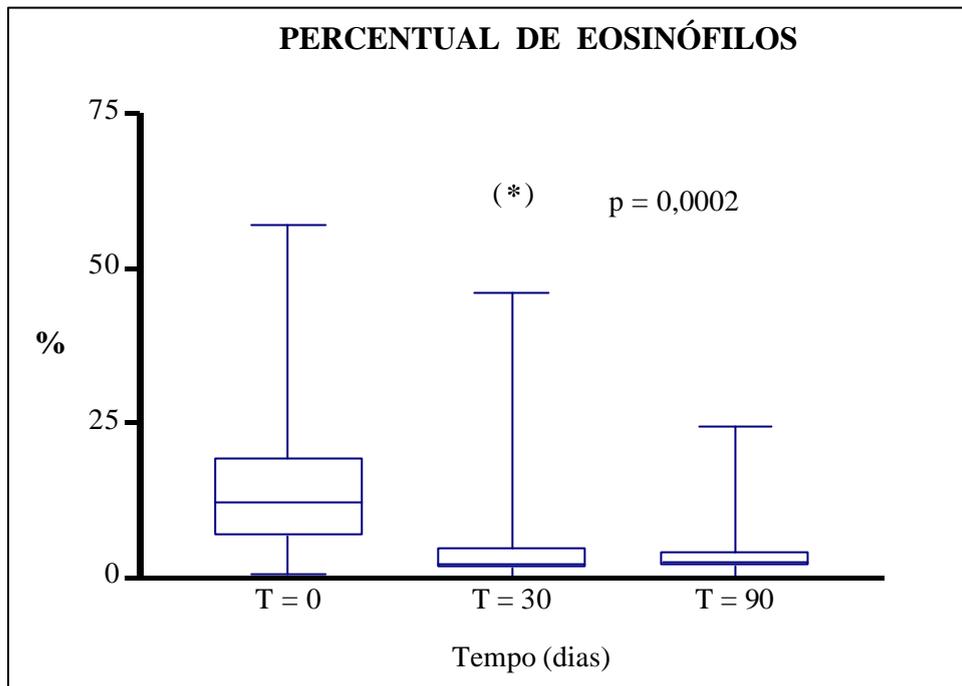


Figura 3 – Percentual de células epiteliais nas amostras de escarro ao longo do tempo; (*) momento de alteração significativa

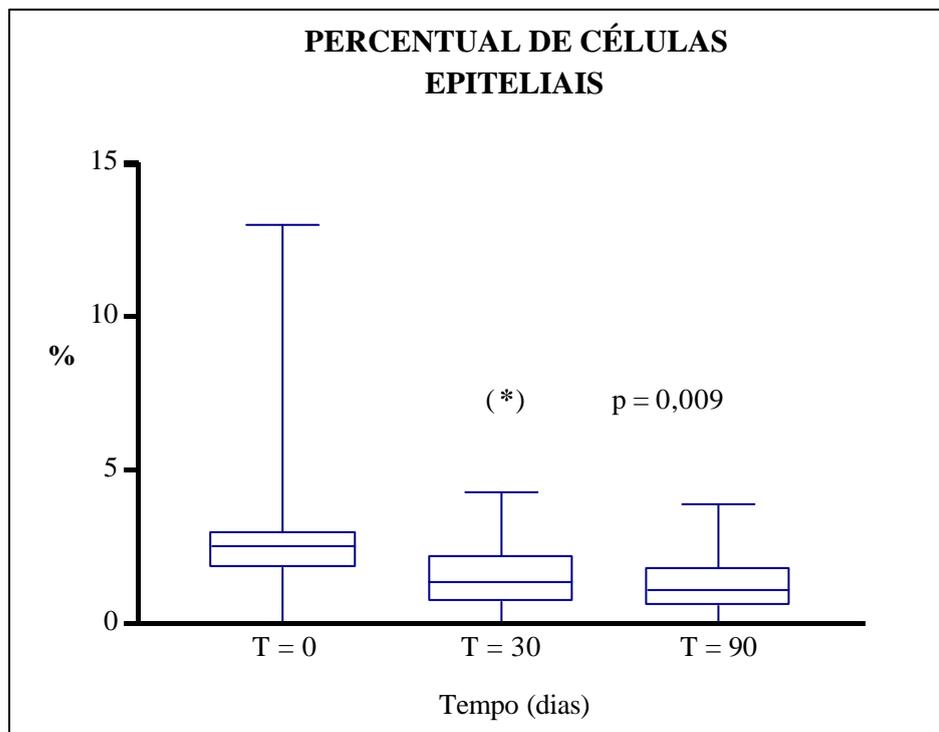
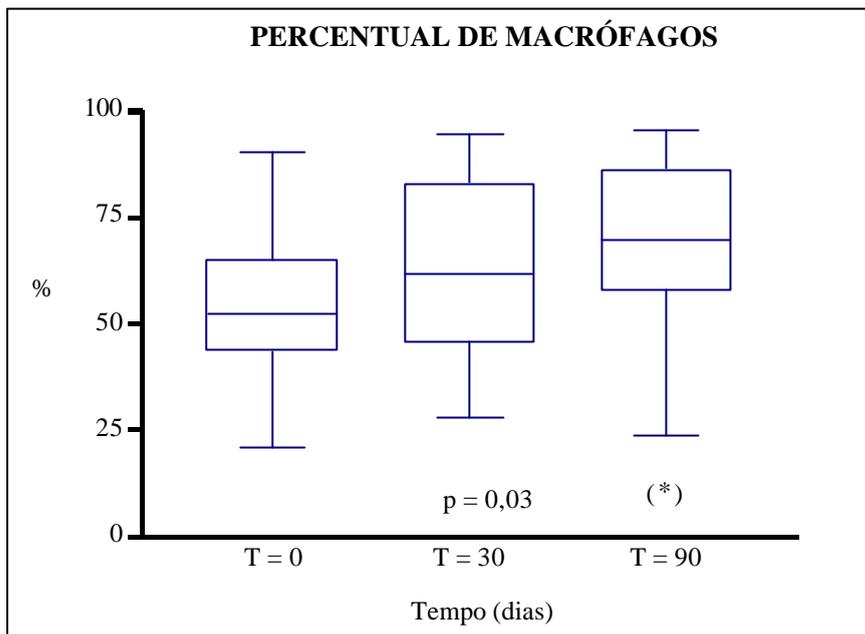


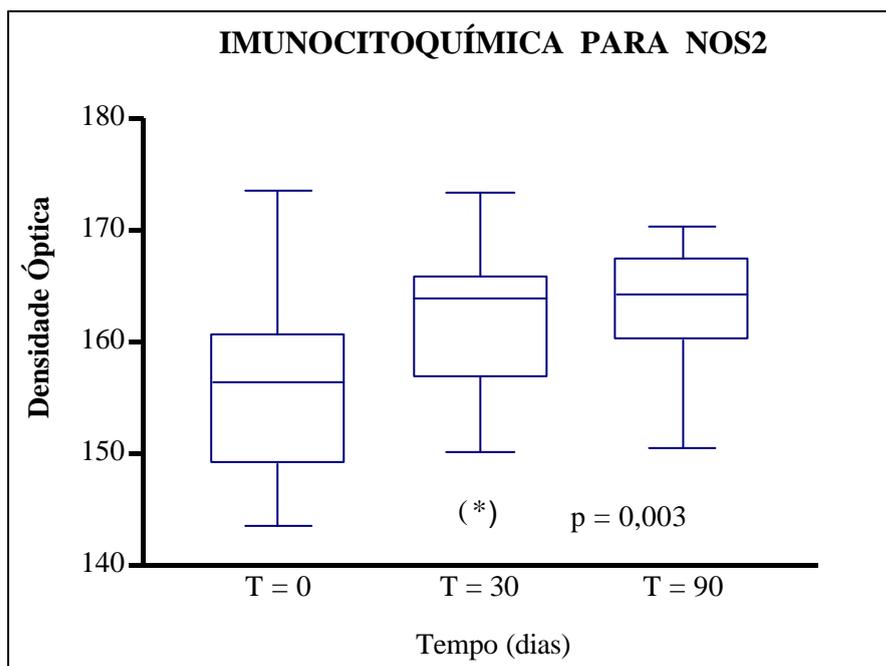
Figura 4 – Percentual de macrófagos nas amostras de escarro ao longo do tempo; (*) momento de alteração significativa



A densidade óptica das colorações para NOS 2 aumentou significativamente aos 30 dias de tratamento e assim persistiu até o final do estudo (p=0,003). Ou seja, a expressão da enzima diminuiu nas células do escarro durante a terapia com DPB (figura 5). Estes achados também foram

mantidos ao analisarmos os dados excluindo os referentes aos pacientes com asma grave (p=0,02). A densidade óptica das colorações de controle (com peptídeo bloqueador) não se modificou durante o tratamento (p=0,49).

Figura 5 – Densidade óptica (DO) das colorações para NOS2 ao longo do tempo; densidades maiores correspondem a menor intensidade de coloração; (*) momento de alteração significativa



A estratificação da amostra pelo VEF₁ no início do tratamento indicou que os pacientes com VEF₁ > 80% do previsto tiveram expressão da enzima menor que os pacientes com VEF₁ < 80% antes e durante o tratamento (p=0,01), porém os dois gru-

pos tiveram evolução semelhante durante o estudo, com redução da expressão da NOS 2 (p=0,82) (figura 6). A estratificação pela gravidade, de acordo com a GINA, resultou nos mesmos achados (figura 7).

Figura 6 – Médias de densidade óptica (DO) da NOS2 após estratificação pelo volume expiratório forçado em 1 segundo inicial, ao longo do estudo (símbolos = médias e barras de desvio padrão; p se refere a diferença entre os dois grupos)

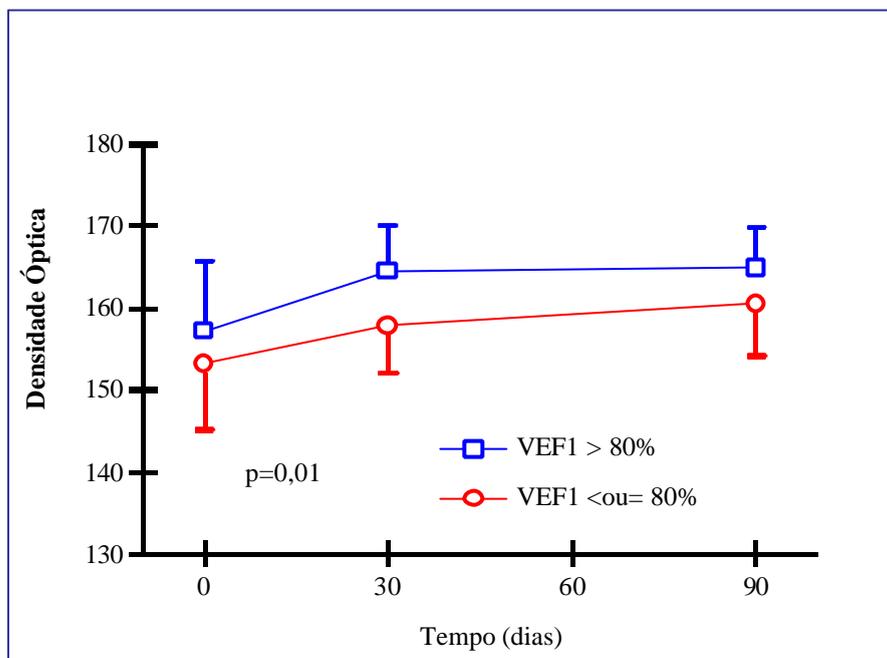
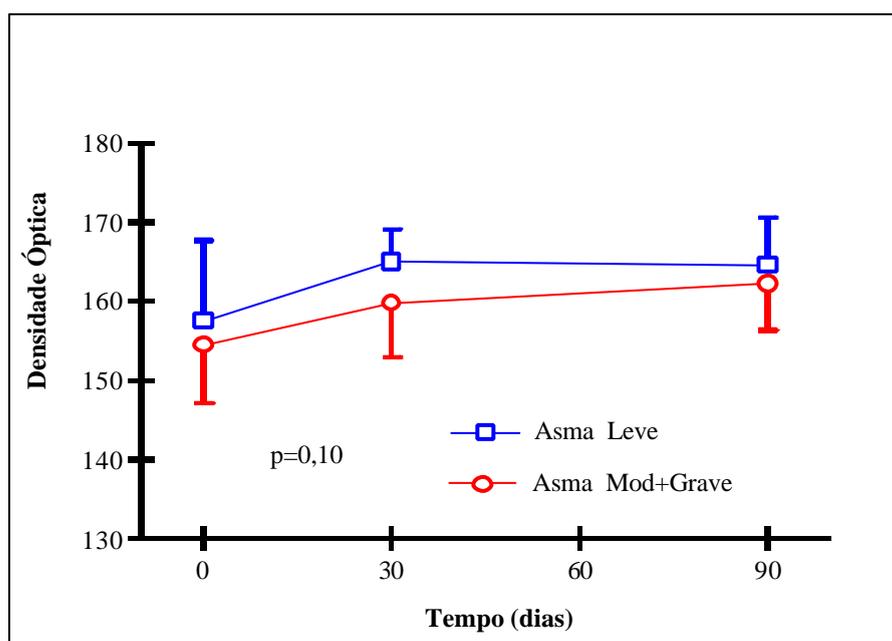


Figura 7 - Médias de densidade óptica (DO) da NOS2 após estratificação pela gravidade inicial (GINA), ao longo do estudo (símbolos = médias e barras de desvio padrão; p se refere a diferença entre os dois grupos)



Observamos correlação negativa entre a densidade óptica das colorações para NOS2 e o percentual de eosinófilos no escarro antes do tratamento ($p=0,03$ / $r= -0,50$), mas não aos 30 e 90 dias de tratamento. Em outras palavras, houve correlação positiva entre a expressão da enzima e a contagem de eosinófilos antes da corticoterapia

(figura 8). Não encontramos correlação significativa entre a expressão da enzima e as outras células ao longo do estudo.

A figura 9 ilustra colorações por imunocitoquímica para NOS2 nas células do escarro induzido de paciente com asma grave, no início e ao final do tratamento.

Figura 8 – Gráfico de correlação entre densidade óptica na imunocitoquímica para NOS2 e o percentual de eosinófilos no escarro ao início do estudo (r = coeficiente de Pearson)

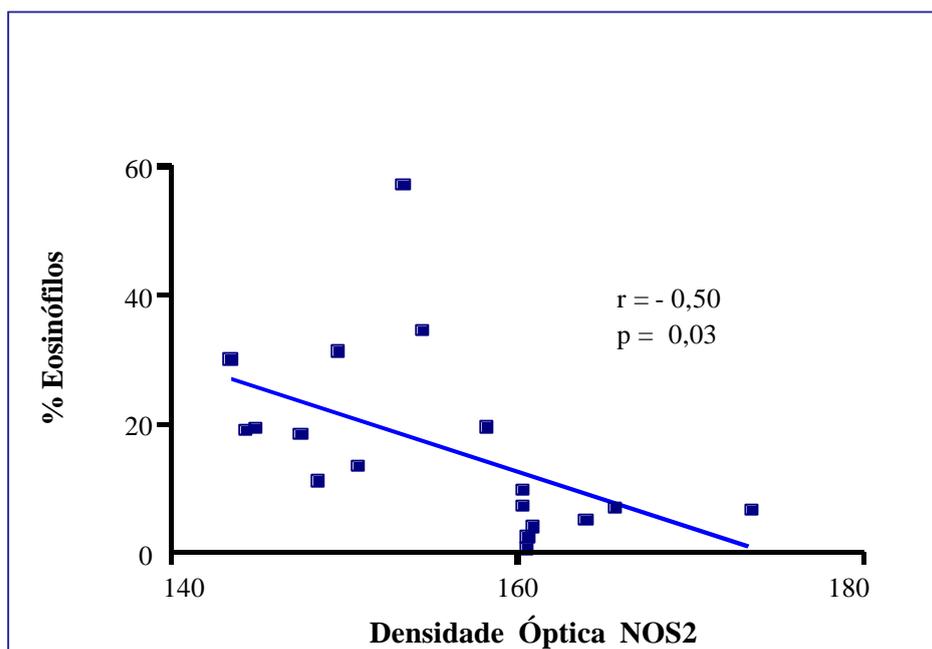
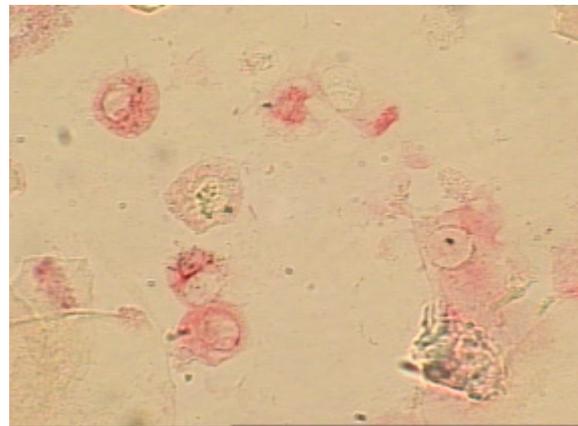
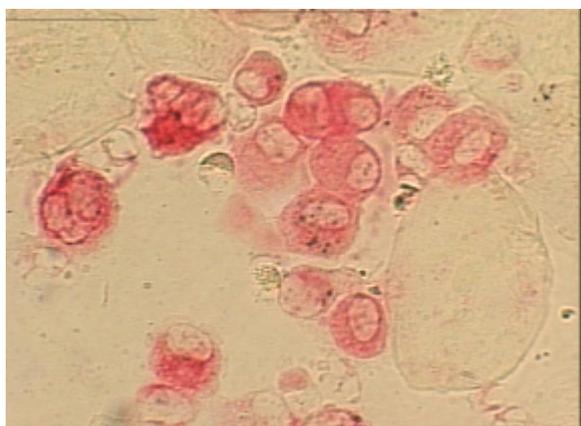


Figura 9 – Coloração por imunocitoquímica para NOS2 em células do escarro induzido de paciente com asma grave : A – antes do tratamento / B - após o tratamento



Discussão

Os resultados sugerem que o tratamento com DPB inibe significativamente a expressão da NOS2 em células da via aérea de asmáticos. Eles também ratificam o benefício do tratamento sobre parâmetros clínicos, funcionais e celulares associados à atividade inflamatória e à gravidade da doença.

Conforme outros relatos, observamos redução dos percentuais de eosinófilos e de células epiteliais no escarro durante o tratamento. Essa redução já foi significativa aos 30 dias de tratamento e persistiu até o final do estudo, o que demonstra um efeito rápido e duradouro do glicocorticoide inalado na inflamação eosinofílica e na descamação epitelial¹⁰⁻¹³. A contagem de macrófagos aumentou e alcançou significância estatística aos 90 dias de tratamento, representando o restabelecimento do perfil normal de infiltração celular da árvore brônquica induzida pelo tratamento, em paralelo com a redução da infiltração eosinofílica nas vias aéreas inferiores.

Não observamos modificação significativa dos percentuais de linfócitos e neutrófilos no escarro. De forma similar, Claman *et al*¹⁴, ao estudarem o efeito do tratamento com prednisona durante seis dias de tratamento não encontraram mudança na contagem destas células no escarro induzido. Pizzichini *et al*¹⁵ trataram um grupo de asmáticos com prednisolona seguida de budesonida durante 21 dias, e não observaram mudança no percentual de neutrófilos no escarro. Nossos resultados confirmaram estas observações durante um tempo maior de tratamento.

Características particulares da interação entre linfócitos e a matriz extra-celular ou outras células na submucosa podem estar relacionadas à menor capacidade dos linfócitos alcançarem a luz brônquica, tornando o escarro induzido menos eficiente para o estudo da cinética destas células nas vias aéreas. De acordo com essa hipótese, vários estudos demonstram que a biópsia brônquica e o lavado bronco-alveolar são métodos melhores que o escarro induzido para avaliar o efeito da terapia anti-inflamatória sobre o infiltrado linfocitário em brônquios de asmáticos¹⁶⁻²¹.

Houve redução significativa da expressão da NOS2 já no início do tratamento com glicocorticoide. Nossos resultados estão de acordo com

conceitos atuais sobre o seu efeito inibitório sobre a expressão da enzima^{4, 22-27}, e também com resultados relatados por Kharitonov *et al*²⁸, que observaram inibição da sua expressão em cultura de células epiteliais brônquicas pela dexametasona. Além disso, a boa especificidade do anticorpo NO53⁶ e a não alteração das densidades ópticas nas colorações onde foi adicionado o peptídeo bloqueador (NO54) é compatível com um efeito inibitório do tratamento sobre a expressão da NOS2 nas vias aéreas desse grupo de asmáticos. Este fenômeno também foi descrito em estudos que usaram outros métodos, inclusive a medida da concentração do óxido nítrico (NO) no ar expirado, com resultados semelhantes²⁸⁻³⁵. Estes estudos envolveram períodos menores de seguimento, de até 21 dias. Nossos resultados não só confirmam tais observações, mas as estendem para um período maior, sugerindo que o efeito inibitório do glicocorticoide sobre a produção excessiva de NO persiste enquanto o tratamento é mantido.

É interessante observar que os pacientes com maior VEF₁ antes do início do tratamento tiveram menor expressão da NOS2 nas células do escarro quando comparados com os pacientes com valores menores de VEF₁, sugerindo uma correlação positiva entre a produção de NO e a gravidade da obstrução brônquica na asma. Também encontramos correlação positiva entre o percentual de eosinófilos e a expressão da NOS2 no escarro antes do tratamento, mas não após 30 dias. É possível que a grande redução do percentual de eosinófilos no escarro e o tamanho da amostra não tenham permitido a detecção dessa correlação durante o tratamento.

Em conclusão, a expressão da NOS2 nas células da via aérea inferior de asmáticos diminuiu durante o tratamento com DPB. Essa redução foi significativa, independente da duração da doença e da sua gravidade antes do início do tratamento. A obstrução brônquica correlacionou-se com a expressão da enzima durante todo o estudo. A terapia anti-inflamatória resultou em redução significativa da inflamação eosinofílica e da descamação da células epiteliais.

Esses achados acrescentam mais dados à compreensão dos mecanismos envolvidos na inflamação brônquica da asma, indicam mais um alvo potencial para a terapia anti-inflamatória nessa doença, a superprodução de NO nas vias aéreas, e

ainda chamam atenção para a utilidade da medida do NO nas vias aéreas como marcador do processo inflamatório e da resposta ao tratamento.

Observações e agradecimentos

Esse estudo teve apoio financeiro da CAPES, FAPERJ e FUJB.

Os anticorpos NO53 e NO54 foram cedidos pelo Dr. Carl Nathan (Cornell University, NY, USA).

O estudo foi apresentado no Curso de Pós-graduação em Clínica Médica – Setor Imunologia – da FM-UFRJ para obtenção do título de mestre em medicina pelo primeiro autor (aprovado com conceito A – nota 10). Orientador – Prof José Roberto Lapa e Silva.

Referências bibliográficas

- [NIH] National Institutes of Health. Global Initiative for Asthma. National Heart, Lung, and Blood Institute Publication 1995; number 95: p.3659.
- Ellis JL, Udem BJ. Inhibition by FN-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airways. *Am Rev Respir Dis*, 1992;146:1543-7.
- Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airway. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994;149:538-51.
- Barnes PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*, 1996;51:218-20.
- Barnes PJ, Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today*, 1995;16(3): 128-30.
- Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, *et al.* Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 1992;47:25-9.
- Nicholson S, Bonecini-Almeida MG, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie Q, Humford R, *et al.* Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*, 1996;183:1-10.
- Sampaio FJB, Pinto JLF, Silva-Costa W, Pereira MJS. Quantitative analysis of smooth muscle fibers in corpus cavernosum of human fetuses. *J Urology*, 1998;159:2226-8.
- Nascimento-Saba CCA, Brito AC, Pereira MJS, Carvalho JJ, Rosenthal D. [Autoradiographic thyroid evaluation in short-term experimental diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Research*, 1998; 31:299-302.
- Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis*, 1989;139:806-17.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barnéon G, Ghavanian N, Enander I, *et al.* Eosinophilic inflammation in asthma. *New Eng J Med*, 1990; 323:1033-9.
- Corrigan CJ, Kay AB. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol. Today*, 1992;13:501-6.
- Bousquet J, Chanez P, Campbell AM, Vignola AM, Godard P. Cellular inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25 (suppl. 2):39-42.
- Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy JV. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 1994; 94:861-9.
- Pizzichini MMM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Mahony J, Dolovich J, *et al.* Sputum in severe exacerbations of asthma. Kinetics of inflammatory indices after prednisone treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997;155: 1501-8.
- Maestrelli P, Saetta M, Di Stefano A, Calcagni PG, Turato G, Ruggieri MP, *et al.* Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995;152: 1926-31.
- Keatings VM, Evans DJ, Oconnor BJ, Barnes PJ. Cellular profiles in asthmatic airways: A comparison of induced sputum, bronchial washings, and bronchoalveolar lavage fluid. *Thorax*, 1997;52: 372-4.
- Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonid, and of a beta 2 agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1992;90:32-42.
- Trigg CJ, Manolistas ND, Wang J, Calderon MA, McAulay A, Jordan SE, *et al.* Placebo-controlled immunopathological study of four months inhaled corticosteroids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994;150:17-22.
- Pauwels R. Future of anti-inflammatory therapy in asthma. *Allergy*, 1995;50(suppl 22):27-31.
- Djukanovic R, Homeyard S, Gratziau C, Madden J, Walls A, Montefort S, *et al.* The effect of treatment with oral corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997;155:826-32.

22. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992;6:3051-64.
23. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax*, 1993;48:1034-43.
24. Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, *et al.* Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, 1993;342:1510-3.
25. Förstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1995;352(4):351-64.
26. Howarth PH, Redington AE, Springall DR, Martin U, Bloom SR, Polak JM, *et al.* Epithelially derived endothelin and nitric oxide in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995;107:228-30.
27. Mizutani T, Layon AJ. Clinical applications of nitric oxide. *Chest*, 1996;110:506-24.
28. Kharitonov SA, Yates D, Springall DR, Buttery L, Polak J, Robbins RA, *et al.* Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest*, 1995;107(3) suppl.:1565-75.
29. Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995;152:800-3.
30. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995;152:892-6.
31. Nelson BV, Sears S, Woods J, Ling CY, Hunt J, Clapper LM, *et al.* Expired nitric oxide as a marker for childhood asthma. *J Pediatr*, 1997; 130(3):423-7.
32. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*, 1994;343:133-5.
33. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996;153:454-7.
34. Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J*, 1996;9(2):196-201.
35. Buchvald F, Binsgaard H. FeNO measured at fixed exhalation flow rate during controlled tidal breathing in children from the age of 2 years. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001;163 (3 Pt 1):699-704.

Endereço para correspondência

Eduardo Costa

R. Conde de Bonfim, 297/sala 306 – Tijuca

20520-051 - Rio de Janeiro – RJ

Tel: 0XX-21-2568.7118 / 2569.2401

Cel. 0XX-21-99752270

E-mail: eduardocostamd@hotmail.com