
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

CAMILA Z. PARREIRA SCHMIDT

**ESTUDO DE NOVOS MODELOS EXPERIMENTAIS EM
DOENÇA PULMONAR ALÉRGICA EM MODELO MURINO**

**PORTO ALEGRE
2011**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUCRS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**ESTUDO DE NOVOS MODELOS
EXPERIMENTAIS EM DOENÇA PULMONAR
ALÉRGICA EM MODELO MURINO**

Camila Z. Parreira Schmidt

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina da PUCRS para obtenção de título de Mestre em
Medicina/Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Porto Alegre, 2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

S353e Schmidt, Camila Zanelatto Parreira

Estudo de novos modelos experimentais em doença pulmonar alérgica em modelo murino / Camila Zanelatto Parreira Schmidt. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

60 f.: gráf. il. tab. Inclui um artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. ASMA. 2. HIPERSENSIBILIDADE RESPIRATÓRIA. 3. ALERGIA E IMUNOLOGIA. 4. OVALBUMINA. 5. MURIDAE. 6. CAMUNDONGOS. 7. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. 8. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA. 9. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 616.23

C.D.U. 616.248:599.323.4(043.3)

N.L.M. WF 150

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho não poderia deixar de agradecer a todas aquelas pessoas especiais que muito me ajudaram nessa importante conquista da minha vida profissional.

Inicialmente agradeço aos meus colegas do Laboratório de Respirologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, que muito me auxiliaram desde os primeiros momentos em um laboratório até os últimos passos para a conclusão desse trabalho. Aos bolsistas de iniciação científica Alisson Schleich, Ana Claudia Pereira, Nailê Nuñez e Rodrigo Godinho de Souza, à técnica do laboratório Caren Cristina de Oliveira e aos colegas Gustavo Leivas Barbosa, Raquel Cao e Mauro Henrique Moraes Vargas.

À colega e amiga Lucien Gualdi que sempre esteve disposta a ajudar, até mesmo nas últimas tarefas e mesmo com a distância que nos separa atualmente.

À colega de profissão e amiga Andrea Rodrigues que me acompanha em todos os momentos há mais de 3 anos, sempre alegre e entusiasmada.

À Carla Rothmann, secretária do curso de pós-graduação, que sempre me ajudou em todos os imprevistos.

À Rita Mattiello e Paula Vidal por estarem sempre prontas a ajudar e pelo suporte técnico nos momentos finais.

Ao Tiago Giuliani Lopes, técnico do serviço de patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, e ao Dr. Diego Uchoa, médico do serviço de patologia do hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela ajuda imprescindível na análise histológica do meu trabalho.

Ao grupo de pneumologia pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS, Taisa Paim, Prof. Dr. Renato Stein, Prof. Dr. Marcus Jones, Prof. Dr. Leonardo Pinto e Prof. Dr. Paulo Maróstica, pela amizade e apoio profissional.

Ao CNPq pela bolsa de incentivo à pesquisa.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez, que desde a época da minha residência em Pediatria sempre esteve presente quando precisei, me orientando e ajudando nos momentos difíceis e incentivando minha carreira profissional.

À minha amada família: meu marido Luciano pelo carinho, pela paciência, pelo companheirismo e pelo apoio constante. A minha filha Luísa que “trabalhou” comigo durante todo esse período. A minha mãe Diva pela dedicação e disponibilidade sempre que precisei. Ao meu pai Paulo que, mesmo não estando mais perto de mim, sempre foi meu exemplo e meu incentivo, me dando amor e apoio em todas as minhas decisões.

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira me ajudaram nessa conquista: muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** - Instilação de OVA intraperitoneal em camundongo BALB/c. 14
- Figura 2** - Instilação de OVA intranasal em camundongo BALB/c, após anestesia geral em câmara anestésica. 15

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Protocolos utilizados para indução de resposta inflamatória aguda em pulmões de camundongos BALB/c fêmeas.. 43
- Figura 2** - Protocolos utilizados para indução de resposta pulmonar alérgica crônica em camundongos BALB/c fêmeas..... 45
- Figura 3** - Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados no modelo agudo. 46
- Figura 4** - Análise histológica dos grupos de camundongos estudados..... 46
- Figura 5** - Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados no modelo crônico. 46
- Figura 6** - Análise histológica dos grupos crônicos de camundongos estudados.. ... 46
-

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Características do processo inflamatório na asma. 24

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Divisão dos grupos e número de animais utilizados nos protocolos agudos, de acordo com a sensibilização (via de administração, número de doses e utilização ou não de adjuvante). 41

Tabela 2 - Divisão dos grupos estudados e número de animais utilizados no modelo crônico, de acordo com a sensibilização (via de administração, número de doses e utilização ou não de adjuvante). 42

LISTA DE ABREVIATURAS

CTC	Contagem total de células
Ctle	Controle
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
HE	Hematoxilina-eosina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
LBA	Lavado broncoalveolar
OVA	Ovalbumina
s.c.	Subcutâneo
Th2	Células CD4 T auxiliar do tipo 2
RB	Remodelamento Brônquico
MB	Membrana Basal

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 REFERÊNCIAS.....	17

CAPÍTULO II

2 ARTIGO DE REVISÃO	20
----------------------------------	-----------

CAPÍTULO III

3 ARTIGO ORIGINAL.....	36
-------------------------------	-----------

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

Asma é uma doença crônica das vias aéreas que ocorre em todas as idades em todo o mundo, frequentemente iniciada na infância. Sua prevalência tem aumentado nas últimas quatro décadas em alguns países, sendo em muitos lugares a doença crônica mais comum na infância. Estima-se que 300 milhões de pessoas sofram dessa doença em todo o mundo, representando um problema global e com elevada morbidade e mortalidade, tendo assim grande importância econômica, necessitando de amplos investimentos em novos tratamentos para seu melhor controle.^{1,2}

A asma é caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiperresponsividade das vias aéreas inferiores, levando a episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, dor torácica e tosse, principalmente à noite e ao despertar. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma estão associados à genética e a componentes ambientais. A inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença, envolvendo inúmeras células e mediadores inflamatórios.² A infiltração de células CD4+ T-helper 2 (Th2) e eosinófilos nas vias aéreas, associada à elevação de imunoglobulina (Ig) E alérgeno-específica no plasma são os principais componentes envolvidos no mecanismo da doença. As células Th2 são responsáveis pela secreção de interleucinas (IL-4 e IL-5), que estimulam a síntese de IgE, e o recrutamento/ativação de eosinófilos.³

Devido à alta prevalência da doença em todo o mundo, a asma é uma doença amplamente estudada. As pesquisas nessa área têm crescido exponencialmente, mostrando que a asma é uma complexa e heterogênea doença impulsionada por inúmeros processos em nível celular, molecular e genético. Para um melhor entendimento dos seus mecanismos e identificação de novos caminhos de terapias medicamentosas, muitos estudos ainda devem ser conduzidos. No entanto, por razões éticas, o conhecimento novo da doença tem sido freado pela necessidade de exames invasivos (ex: biópsias brônquicas) que auxiliam para um melhor conhecimento da fisiopatogenia e desenvolvimento da doença. Estes estudos tornam-se muitas vezes inviáveis em humanos, particularmente em crianças. Neste aspecto, os modelos animais, mesmo com suas limitações translacionais, são uma linha atraente de pesquisa nesta área. Dessa maneira, parte desse trabalho de Mestrado foi conduzida em busca de um protocolo mais “ideal” de modelo animal para o aprimoramento de estudos dessa doença.

Em nosso laboratório de pesquisa temos estudado modelos agudos de asma, como na maioria dos centros de pesquisa do mundo, em busca de novas terapias para o controle, e até mesmo, quem sabe, prevenção da doença. Entretanto, sabemos que a asma é uma doença crônica, que se inicia muitas vezes ainda no primeiro ano de vida. Assim, o desenvolvimento de protocolos crônicos da doença em modelos animais deve ser melhor estabelecido e entendido. Com isto, revisamos protocolos não só da doença aguda, mas também da asma na sua fase crônica e desenvolvemos um modelo, discutido na literatura, mas testado pela primeira vez sob alguns aspectos no nosso laboratório, que é o estudo central desta dissertação de Mestrado.

A partir do interesse pelo estudo da asma na fase crônica, observamos que determinadas características patológicas ocorrem de forma não reversível. Sabemos que a inflamação persistente das vias aéreas inferiores pode resultar no que chamamos de remodelamento brônquico (RB), característica que pode ser observada quando amostras histológicas são analisadas na asma crônica, e que parecem desenvolver-se nos primeiros anos de vida do paciente e da doença. Dessa forma, decidimos estudar o tema remodelamento brônquico na criança, escrevendo um artigo de revisão sobre o assunto para apresentação neste Mestrado, discutindo a escassa literatura no assunto.

Asma e modelo animal

Os modelos animais têm sido utilizados há mais de 100 anos para elucidar a fisiopatogenia de doenças humanas e para avaliar novos alvos terapêuticos. Tornaram-se a ferramenta que permite que estudos sejam conduzidos em um contexto com sistemas biológicos “íntactos”. Os modelos murinos de asma desencadeiam uma importante resposta alérgica Th2 e têm sido úteis para um melhor entendimento dos processos de mecanismo de doença alérgica e testes pré-clínicos de novos fármacos.^{4, 5} No entanto, grande número de medicamentos que mostraram relativa eficácia em modelos animais de asma teve pouco benefício clínico, quando utilizados em ensaios clínicos em humanos.⁴

Nenhum animal de laboratório desenvolve características exatamente iguais à asma em humanos.⁶ Mesmo assim, devido principalmente a aspectos éticos de pesquisa, modelos animais tem sido desenvolvidos e utilizados, com processo de sensibilização a antígenos, e posterior desafio das vias aéreas, a fim de desencadear uma resposta pulmonar alérgica semelhante à asma em humanos.⁴

Muitas características da asma atópica foram descobertas em alguns modelos animais, entre eles camundongos, ratos, ovelhas, gatos, cachorros e cavalos.⁷ Os camundongos são o modelo mais popularmente utilizado para avaliação da resposta alérgica das vias aéreas. Esta é a espécie ideal para o estudo de várias doenças já que possuem genética detalhadamente conhecida, são animais de fácil manipulação e apresentam custo relativamente baixo.^{4,8,9} Além disso, os camundongos são facilmente sensibilizados com inúmeros antígenos, aos quais não estão normalmente expostos, incluindo a ovalbumina (OVA),^{4, 10} poeira doméstica,¹¹ *Aspergillus fumigatus*,¹² extrato de erva-daninha,¹³ entre outros. A sensibilização e posterior desafio com esses antígenos resultam em uma clara resposta Th2, elevando níveis de IgE alérgeno-específica e gerando uma inflamação eosinofílica.¹⁴

Existem diversos protocolos de sensibilização dos animais, sendo mais utilizado o modelo murino com fêmeas adultas (6-8 semanas) da espécie BALB/c, através da sensibilização com OVA e hidróxido de alumínio (alum), via intraperitoneal (Figura 1), com intervalo de 14 dias, e posterior desafio com OVA após 11 dias, utilizando a via intranasal (Figura 2), durante 3 dias consecutivos para os modelos agudos e durante 8 semanas para os modelos crônicos. No entanto, estes protocolos têm sido bastante criticados por utilizar um adjuvante (alum) para

sensibilização ao antígeno, agente este que potencializa artificialmente a resposta imune e a produção de citocinas de características alérgicas. Conrad et al. recentemente realizaram um experimento para modelos de asma agudo demonstrando que o uso de um protocolo sem adjuvante e com sensibilização subcutânea com OVA era tão eficaz quanto o protocolo tradicionalmente utilizado com OVA intraperitoneal com adjuvante.¹⁵ A partir de então reproduzimos um estudo semelhante, sensibilizando os animais com OVA via subcutânea sem a utilização de alum, porém em um período de tempo mais curto. Além disso, protocolos de asma crônica também têm sido bastante criticados e precisam ser aprimorados. Assim, desenvolvemos também um protocolo de asma crônica utilizando sensibilização via subcutânea e livre de adjuvante.



Figura 1- Instilação de OVA intraperitoneal em camundongo BALB/c.



Figura 2- Instilação de OVA intranasal em camundongo BALB/c, após anestesia geral em câmara anestésica.

Asma e remodelamento

Com a escassa literatura sobre RB em asma, principalmente em crianças, temos estudado protocolos de asma na sua fase crônica, analisando a histologia do pulmão de camundongos, observando a presença de características relacionadas ao que chamamos de remodelamento brônquico. Decidimos então aprimorar os conhecimentos nesta área, bastante discutida na literatura, mas ainda com inúmeras perguntas sem respostas definidas.

Muitos pacientes asmáticos em idade adulta apresentam alterações crônicas na estrutura das paredes das vias aéreas (ver artigo de revisão).¹⁶ Fatores de risco para o desenvolvimento de RB ainda são muito pouco claros.¹⁷ Muitos autores

observaram características semelhantes de remodelamento em adultos e crianças pré-escolares sibilantes,¹⁸ porém não sabemos ao certo quando essas alterações começam a se desenvolver.

Concluindo esta introdução, a presente dissertação apresenta um artigo original e um artigo de revisão intitulados, respectivamente, "Estudo de novos modelos experimentais em doença pulmonar alérgica em modelo murino" e "Remodelamento brônquico na asma da criança".

1.2 REFERÊNCIAS

1. Pitrez PMC, Stein RT, Martinez FD. The Global Burden of Asthma. *Pediatric Respiratory Medicine: Elsevier*; 2008. p. 779-81.
 2. GINA report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention. [updated December 2009; cited 2010 March 20]; Available from: <http://www.ginasthma.com/GuidelinesResources.asp?l1=2&l2=0>.
 3. Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *International archives of allergy and immunology*. 2005;138(4):298-304. Epub 2005/10/13.
 4. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2007;37(7):973-88. Epub 2007/06/22.
 5. Shichijo M, Inagaki N, Nakai N, Kimata M, Nakahata T, Serizawa I, et al. The effects of anti-asthma drugs on mediator release from cultured human mast cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1998;28(10):1228-36. Epub 1998/11/21.
 6. Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2000;49(12):639-54. Epub 2001/02/24.
 7. Torres R, Picado C, de Mora F. [Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the condition in humans]. *Archivos de bronconeumologia*. 2005;41(3):141-52. Epub 2005/03/16. Descubriendo el asma de origen alergico a traves del raton. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alergica en el raton y su similitud con el asma alergica humana.
 8. Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*. 1996;380(6570):149-52. Epub 1996/03/14.
 9. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(3):291-7. Epub 2003/02/06.
 10. Zosky GR, von Garnier C, Stumbles PA, Holt PG, Sly PD, Turner DJ. The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. *Respiratory research*. 2004;5:15. Epub 2004/09/24.
 11. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway
-

-
- inflammation and structural remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(3):378-85. Epub 2003/11/05.
12. Fattouh R, Pouladi MA, Alvarez D, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, et al. House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(3):314-21. Epub 2005/05/10.
 13. Mehlhop PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, et al. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(4):1344-9. Epub 1997/02/18.
 14. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999;402(6760 Suppl):B12-7. Epub 1999/12/10.
 15. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kilic A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(8):1246-54. Epub 2009/05/15.
 16. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annual review of medicine*. 2002;53:477-98. Epub 2002/01/31.
 17. Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(3):603-6. Epub 2008/03/11.
 18. Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2008;57(1):11-9. Epub 2008/01/23.
-

CAPITULO II

1 ARTIGO DE REVISÃO

Título: Remodelamento brônquico em crianças com asma

Autores: Camila Z. Parreira Schmidt, Paulo Márcio Condessa Pitrez

RESUMO

Remodelamento brônquico (RB) é uma característica não reversível de causa ainda indeterminada que se caracteriza pela inflamação persistente do tecido pulmonar. Espessamento da membrana basal (MB), hiperplasia de células caliciformes, aumento no número de glândulas submucosas, aumento do número e área dos vasos sanguíneos, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa e aumento de depósito de colágeno na parede das vias aéreas são as alterações observadas que caracterizam o remodelamento. O espessamento da MB tem sido descrito em crianças com asma, mas não existem medidas objetivas e não há dados que relacionem essa característica com a idade e a duração dos sintomas em crianças. Também não está claro se o espessamento gradual da MB é uma consequência de repetidos episódios de exposição à alérgenos ou episódios inflamatórios agudos. O objetivo do presente artigo é, revisando a literatura, oferecer um melhor entendimento do processo de remodelamento brônquico, particularmente na criança. Como fonte de dados inicial foi utilizada a base de dados do PubMed, utilizando os descritores *asthma AND remodeling*.

ABSTRACT

Airway remodeling is a non reversible feature of asthma, with undetermined cause, and it is characterized by persistent inflammation of lung tissue. Basement membrane thickening, goblet cells hyperplasia, increased number of submucosal glands, increased number and size of blood vessels, hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle and increased collagen deposition in the airway wall are observed changes in the remodeling process. The basement membrane thickening has been described in children with asthma, but no objective data to relate remodeling with age and duration of symptoms in children has emerged. It is also unclear whether the gradual basement membrane thickening is a consequence of repeated episodes of allergen exposure or acute inflammatory episodes. The aim of this paper is, based on a review of the literature, to provide a better understanding of remodeling, particularly in children. As initial data source, we have used the PubMed databases, searching for *asthma* and *remodeling* keywords.

INTRODUÇÃO

A asma é a doença crônica mais comum da infância, e também uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com aumento considerável na sua prevalência nas últimas décadas.^{1, 2} É uma doença de complexa interação entre fatores ambientais e componentes genéticos, resultando em um processo inflamatório crônico das vias aéreas, caracterizado pelo desenvolvimento de limitação do fluxo aéreo e hiperresponsividade brônquica, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de dispnéia, sibilância, tosse e aperto no peito.³ Todos os compartimentos das vias aéreas, grandes e pequenas, podem apresentar alterações na asma. Em alguns indivíduos predispostos, ainda por causas não determinadas, essa inflamação persistente pode ser acompanhada por alterações morfológicas e funcionais chamadas de remodelamento brônquico, de características não reversíveis.⁴

O remodelamento brônquico das vias aéreas pode ser definido como um processo complexo multicelular que resulta em mudanças estruturais que envolvem a composição, conteúdo e organização de muitos dos componentes celulares e moleculares da parede brônquica.^{5,6} A alteração mais marcante, e onde as repercussões funcionais são mais claramente observadas, ocorre na musculatura lisa do brônquio.⁷ Essas alterações caracteristicamente incluem espessamento da MB, hiperplasia de células caliciformes, aumento no número de glândulas submucosas, aumento do número e área dos vasos sanguíneos, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa e aumento de depósito de colágeno na parede das vias aéreas.⁵ As

mudanças na estrutura da parede das vias aéreas têm sido bem descritas na asma em adultos, sendo que a evidência de espessamento da MB é um sinal específico dessa anormalidade nesses pacientes. Tais alterações estruturais têm sido extensamente estudadas em pacientes asmáticos com diferentes graus de gravidade, na tentativa de melhor caracterizar sua fisiopatogenia, seus principais componentes e, principalmente, sua relação com as alterações funcionais.⁷ O espessamento da MB tem sido descrito em crianças com asma, mas não existem medidas objetivas e não há dados que relacionem o espessamento da MB com a idade e a duração dos sintomas em crianças. Também não está claro se o espessamento gradual da MB é uma consequência de repetidos episódios de exposição à alérgenos ou episódios inflamatórios agudos.⁸ As alterações da inflamação brônquica na asma de origem atópica e no processo de remodelamento brônquico são resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características do processo inflamatório na asma.^{2, 6}

Alterações brônquicas	
Inflamação aguda	Inflamação crônica (Remodelamento)
Broncoconstrição	Fibrose subepitelial
Aumento da permeabilidade vascular	Hiperplasia e hipertofia do músculo liso
Edema	Hiperplasia de glândulas calciformes
Vasodilatação	Angiogênese
Hipersecreção de muco	

Há alguns anos, a inflamação crônica das vias aéreas foi considerada a primeira alteração em pacientes com asma, e o remodelamento como uma consequência posterior da doença. Sendo assim, acreditava-se que o tratamento com corticóides, além de controlar a inflamação, poderia também prevenir o desenvolvimento do remodelamento brônquico. No entanto, alguns estudos sugeriram que o remodelamento brônquico inicia-se muito precocemente e que algumas medidas de prevenção e tratamento são relativamente ineficientes no desenvolvimento dessas alterações ou para sua reversão depois de estabelecidas.^{8,9}

Poucos estudos foram realizados para entender o desenvolvimento do remodelamento brônquico na infância. O objetivo principal deste artigo, revisando a literatura e discutindo as evidências correntes, é oferecer um melhor entendimento do processo de remodelamento brônquico na criança.

Remodelamento brônquico em adultos

Em adultos, as doenças inflamatórias crônicas são as principais responsáveis por alterações estruturais dos pulmões, prejudicando a manutenção da função pulmonar. Asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) são as doenças mais associadas a esta condição.

Em pacientes com asma, o remodelamento brônquico parece iniciar ainda na infância, sem ocorrer destruição do parênquima pulmonar, como acontece na DPOC. Entretanto, as paredes das vias aéreas na asma apresentam-se espessadas e a

excessiva quantidade de muco e exsudato inflamatório causam estreitamento e obstrução do fluxo aéreo. O espessamento precoce da MB, a presença de eosinófilos e linfócitos T auxiliares são características marcantes de pacientes com asma. Diferentemente, metaplasia de pequenas vias aéreas, aumento da musculatura lisa e presença de linfócitos T citotóxicos no parênquima pulmonar foram características encontradas predominantemente em pacientes com DPOC.¹⁰

Inúmeros estudos realizados através de biópsia brônquica de pacientes com asma demonstraram anormalidades no epitélio das vias aéreas. Até pouco tempo, acreditava-se no paradigma do remodelamento como uma alteração crônica, disfuncional e de resposta a uma inflamação em curso, mas esse conceito tem sido contestado. Enquanto muitos estudos demonstraram a perda de função pulmonar associada com exacerbações graves de asma, foi reconhecido que o remodelamento pode ocorrer muito cedo em asmáticos, sendo em alguns casos ainda antes dos sintomas clínicos. Além disso, muitos pacientes asmáticos superam a doença e os sintomas por ela causados por longo período, mesmo sem o uso de medicamentos específicos, como os corticóides inalados, mas alguns desses pacientes apresentam doença subclínica ativa, caracterizada por hiperresponsividade brônquica ou perda de função pulmonar.¹¹

Broekema et al. demonstraram que o remodelamento das vias aéreas persiste mesmo em pacientes assintomáticos e com função pulmonar normal, mesmo sem o uso de tratamento para asma nos últimos três anos. Este estudo também demonstrou que a inflamação das vias aéreas e o remodelamento brônquico são um reflexo do aumento do número de eosinófilos, células T, mastócitos na mucosa das vias aéreas e

espessamento da MB, quando compararam pacientes sem sintomas com uso de medicamentos para asma há pelo menos um ano com um grupo controle sem história de asma. Assim, concluíram que pacientes asmáticos podem apresentar completa remissão das características clínicas da asma, mas o espessamento da MB persiste.¹²

Sabe-se que o espessamento não se altera com a idade, gravidade ou duração da asma. Porém, o total entendimento da relação entre inflamação crônica e surgimento do remodelamento brônquico não está claro, assim como a relação do remodelamento com a perda de função pulmonar.

Remodelamento brônquico em crianças

Há evidências de que os componentes da asma em adultos estão relacionados com a asma na infância, pelo menos em uma proporção significativa dos pacientes. Muitos estudos foram realizados para se saber ao certo quando esse processo se inicia. Pôde-se prever que o remodelamento brônquico seria a última etapa do processo inflamatório da asma, mas atualmente isso parece ser incompatível com os dados pediátricos encontrados na literatura.

Acredita-se que inflamação das vias aéreas e o remodelamento brônquico podem ser eventos paralelos, desencadeados pelo mesmo problema subjacente, mas a progressão de cada um é independente e em processos diferentes.² Estudos em crianças com asma grave e adultos com asma leve e grave mostraram não haver relação entre a duração da asma e qualquer marcador de inflamação, ou uso de

terapia anti-inflamatória. Desse modo, o espessamento da MB parece não ser progressivo, não se alterar de acordo com o início do desenvolvimento da asma e provavelmente não estar estritamente associado a inflamação das vias aéreas.⁵

Um estudo realizado em crianças com média de idade de 12 meses mostrou que lactentes sibilantes com obstrução das vias aéreas reversível, obstrução reversível após uso de broncodilatador e sem obstrução de vias aéreas não apresentaram diferenças significativas em relação à espessura da MB.⁹ Outros estudos mostraram que lactentes sibilantes aos 12 meses de vida apresentam vias aéreas com paredes normais, mas aos 30 meses o espessamento da MB e a inflamação eosinofílica podem começar a surgir.^{5, 13} A inflamação eosinofílica e o espessamento da MB parece não estar presentes em lactentes sibilantes, mas podem ser encontrados em crianças escolares com asma. No entanto, parece não haver associação entre a idade das crianças, a duração da doença, os achados da função pulmonar e a inflamação eosinofílica das vias aéreas.⁸

Em um estudo de coorte, Rasmussen et al. acompanharam durante duas décadas pacientes desde o nascimento até os 26 anos de idade e observaram que o remodelamento está associado a inúmeros fatores tais como sexo masculino, asma, hiperresponsividade das vias aéreas na infância e perda de função pulmonar, não encontrando associação com tabagismo e atopia. Este estudo demonstrou que os pacientes entre 18 e 26 anos de idade com perda de função pulmonar no índice de resposta ao uso de broncodilatador estavam no grupo de maior risco, mesmo com o uso de terapia com corticóide inalado, sugerindo que este índice poderia ser usado como marcador para classificação de remodelamento das vias aéreas. No entanto,

esses autores não puderam demonstrar se o uso precoce de terapia anti-inflamatória poderia reduzir a inflamação persistente das vias aéreas ou o remodelamento brônquico.¹⁴

Alguns autores demonstraram recentemente que a perda da função pulmonar pode ser observada em uma proporção significativa de pacientes jovens com asma, sugerindo fortemente que o remodelamento brônquico pode iniciar muito cedo na vida. Payne et al. compararam crianças com asma grave, com e sem limitação do fluxo aéreo, com crianças normais. Surpreendentemente, as crianças que não tiveram limitação ao fluxo aéreo apresentaram maior grau de espessamento da MB, quando comparados às crianças com limitação do fluxo aéreo e às crianças saudáveis.⁸

Estudos realizados na década de 90, mostraram que o atraso de 2 anos no uso de terapia com corticóide inalado em pacientes adultos com asma resultaram em maior obstrução do fluxo aéreo quando comparados com pacientes com tratamentos precoces e contínuos a longo prazo.¹⁵ Estudos mais recentes, com adultos e crianças, confirmaram o benefício do efeito dos corticóides inalados no declínio acelerado da função pulmonar ao longo do tempo.¹⁶ Outros estudos indicam que o tratamento com corticóide inalado reduz o número de células epiteliais encontradas no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos, sugerindo pouca resposta a essa terapia.¹⁷ Além disso, outros autores mostraram que medidas preventivas e intervenções terapêuticas são relativamente ineficazes no desenvolvimento de alterações das vias aéreas.

Recentemente, Malmstrom et al. puderam observar significativa correlação entre espessamento da MB em crianças e o uso de corticóide inalado. Foram

realizadas biópsias endobrônquicas de crianças com sibilância grave e foi observado que o grande número de células caliciformes encontrada apresentava correlação com a necessidade do uso de corticoide inalado alguns anos depois, sugerindo que a presença dessas células é um importante fator na progressão dos sintomas respiratórios de jovens pacientes. Neste estudo, não foi encontrada associação entre espessamento da MB ou número de células inflamatórias em crianças com 1 ano de vida e função pulmonar dessas crianças aos 3 anos.¹⁸

Para melhor caracterizar o remodelamento brônquico em crianças com asma, Jenkins et al. realizaram broncoscopia com biópsia endobrônquica em seis crianças com asma de difícil controle. Em cada criança, as biópsias endobrônquicas mostraram que a mudança era consistente com remodelamento das vias aéreas, ou seja, aumento da espessura da MB, hipertrofia do músculo liso, com graus variados de células caliciformes e hiperplasia das glândulas submucosas.¹⁹ Além disso, outro estudo com biópsia transbrônquica em crianças em idade escolar com asma demonstrou que há relações inconsistentes entre espessamento da MB epitelial reticular (MB), inflamação, sintomas e obstrução variável ao fluxo aéreo.¹

A inflamação das vias aéreas e remodelamento também foram encontrados em crianças com asma leve e em adolescentes que melhoraram da doença, sugerindo que a inflamação e o processo de reparação podem também estar presentes em pacientes assintomáticos.⁹ Alguns estudos foram realizados a fim de entender melhor o processo do remodelamento brônquico, mas existem poucos dados objetivos que expliquem quando esse processo realmente se inicia.

Por fim, recentemente, Saglani et al realizaram um estudo com camundongos Balb/c a partir do terceiro dia de vida, usando extrato de ácaro por 12 semanas e avaliaram semanalmente a presença de inflamação brônquica, puderam observar que a partir da 2ª semana os animais apresentaram aumento significativo no número de eosinófilos no tecido pulmonar, presença de células califormes foram observadas após a 3ª semana e depósito de colágeno da 4ª semana em diante. Este estudo reforçou a hipótese de que o processo de remodelamento brônquico em asma inicia precocemente na vida e de que as características de fibrose brônquica são persistentes e irreversíveis.²⁰

CONCLUSÃO

Os conhecimentos sobre a asma avançaram muito nos últimos anos, surgindo alguns novos medicamentos. No entanto, ainda existe uma urgente necessidade em identificar a base subjacente da asma, compreender as complexas influências genéticas e ambientais, e desenvolver estratégias de prevenção primária eficazes.²¹

Conhecemos muitas das características da asma em crianças e adultos e sabemos que alguns fatores como a frequência dos episódios de sibilância, história de dermatite atópica, rinite alérgica, história familiar de asma e presença de eosinófilos no sangue auxiliam no diagnóstico e tratamento clínico desses pacientes. No entanto, o conhecimento sobre o desenvolvimento da inflamação das vias aéreas e remodelamento brônquico ainda é muito escasso. Em adultos, podemos encontrar

características desse processo como infiltrado eosinofílico, presença de células caliciformes e ativação de linfócitos T, mas não sabemos ao certo quando esse processo se inicia. A inflamação eosinofílica e espessamento da MB são características encontradas em adultos com asma, crianças escolares com asma grave e pré-escolares com sibilância recorrente. Biópsias brônquicas revelam a presença de grande quantidade de eosinófilos em crianças com asma alérgica grave, quando comparadas com crianças não atópicas. Todavia, algumas características histológicas como espessamento da MB podem ser encontradas nesses pacientes, assim como em asmáticos com asma leve ou moderada e também naqueles não atópicos.

O remodelamento brônquico em crianças pode resultar em perda de função pulmonar não reversível, mas alternativas preventivas ainda não foram encontradas. Os corticoides não parecem prevenir o remodelamento brônquico, apenas eficaz na redução da inflamação eosinofílica. Novos estudos longitudinais com biópsia brônquica de crianças com asma poderiam contribuir para o melhor entendimento do desenvolvimento precoce de remodelamento em crianças, mas estes são estudos difíceis de serem realizados, particularmente devido a dificuldade ética de indicar procedimentos invasivos que não fazem parte da abordagem clínica de rotina. O uso de modelos animais, mesmo com todas as suas limitações translacionais, é uma alternativa atraente para melhor desvendar algumas dessas questões.

REFERÊNCIAS

1. Saglani S, Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(7):722-7. Epub 2005/01/20.
 2. Zhang WX, Li CC. Airway remodeling: a potential therapeutic target in asthma. *World journal of pediatrics : WJP*. 2011;7(2):124-8. Epub 2011/05/17.
 3. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2007;30(1):134-55. Epub 2007/07/03.
 4. Pedersen SE, Hurd SS, Lemanske RF, Jr., Becker A, Zar HJ, Sly PD, et al. Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger. *Pediatric pulmonology*. 2011;46(1):1-17. Epub 2010/10/22.
 5. Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2008;57(1):11-9. Epub 2008/01/23.
 6. Durrani SR, Viswanathan RK, Busse WW. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011. Epub 2011/07/15.
 7. Mauad T. Conseqüências da infamação na asma: remodelamento brônquico. *Pulmao RJ*. 2008;1:S8-S15.
 8. Payne DN, Rogers AV, Adelroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, et al. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(1):78-82. Epub 2002/12/28.
 9. Baena-Cagnani C, Rossi GA, Canonica GW. Airway remodelling in children: when does it start? *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2007;7(2):196-200. Epub 2007/03/14.
 10. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(10 Pt 2):S28-38. Epub 2001/12/06.
 11. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest*. 2010;137(6):1417-26. Epub 2010/06/09.
 12. Broekema M, Timens W, Vonk JM, Volbeda F, Lodewijk ME, Hylkema MN, et al. Persisting remodeling and less airway wall eosinophil activation in
-

- complete remission of asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(3):310-6. Epub 2010/09/04.
13. Bush A, Menzies-Gow A. Phenotypic differences between pediatric and adult asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009;6(8):712-9. Epub 2009/12/17.
 14. Rasmussen F, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Greene JM, Herbison GP, et al. Risk factors for airway remodeling in asthma manifested by a low postbronchodilator FEV1/vital capacity ratio: a longitudinal population study from childhood to adulthood. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165(11):1480-8. Epub 2002/06/05.
 15. Haahtela T, Jarvinen M, Kava T, Kiviranta K, Koskinen S, Lehtonen K, et al. Effects of reducing or discontinuing inhaled budesonide in patients with mild asthma. *The New England journal of medicine*. 1994;331(11):700-5. Epub 1994/09/15.
 16. Pauwels RA, Pedersen S, Busse WW, Tan WC, Chen YZ, Ohlsson SV, et al. Early intervention with budesonide in mild persistent asthma: a randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2003;361(9363):1071-6. Epub 2003/04/04.
 17. Walters EH, Reid DW, Johns DP, Ward C. Nonpharmacological and pharmacological interventions to prevent or reduce airway remodelling. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2007;30(3):574-88. Epub 2007/09/04.
 18. Malmstrom K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Sarna S, Lindahl H, Kajosaari M, et al. Lung function, airway remodelling and inflammation in symptomatic infants: outcome at 3 years. *Thorax*. 2011;66(2):157-62. Epub 2011/01/05.
 19. Jenkins HA, Cherniack R, Szeffler SJ, Covar R, Gelfand EW, Spahn JD. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. *Chest*. 2003;124(4):1318-24. Epub 2003/10/14.
 20. Saglani S, Mathie SA, Gregory LG, Bell MJ, Bush A, Lloyd CM. Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite-exposed neonatal mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;41(3):281-9. Epub 2009/01/20.
 21. Holgate ST. Has the time come to rethink the pathogenesis of asthma? *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2010;10(1):48-53. Epub 2009/11/17.
-

CAPITULO III

3 ARTIGO ORIGINAL

Título: Estudo de novos modelos experimentais em doença pulmonar alérgica em modelo murino.

Autores: Camila Z. Parreira Schmidt, Paulo Marcio Condessa Pitrez

RESUMO

Introdução: estudos em modelos animais de asma têm sido criticados devido a algumas limitações. Protocolos com características e resultados distantes da asma em humanos são muito utilizados, principalmente devido à necessidade do uso de adjuvante e administração intraperitoneal do alérgeno para sensibilização.

Objetivo: testar alternativas de protocolos com modelos animais de asma aguda e crônica que apresentem características mais próximas da doença em humanos, utilizando OVA livre de adjuvante.

Métodos: foram utilizadas fêmeas adultas de camundongos BALB/c, divididas em grupos de acordo com as sensibilizações com OVA. O modelo agudo utilizou duas doses de OVA subcutânea (s.c.), sem adjuvante, com intervalo de 7 dias, com posterior desafio intranasal (i.n.) durante 3 dias, comparado ao protocolo padrão que utiliza 3 doses de OVA intraperitoneal (i.p.), no período de sensibilização. O modelo crônico também utilizou OVA s.c. livre de adjuvante para sensibilização, com intervalo de 14 dias e posterior desafio i.n., 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Contagem total (CTC) e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) e análise histológica dos pulmões foram realizadas 24 horas após o último desafio com OVA.

Resultados: nos dois modelos estudados, agudo e crônico, observamos uma resposta eosinofílica pulmonar semelhante entre os grupos. Contagem de células e análise histológica do tecido pulmonar não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados.

Conclusão: o uso de sensibilização s.c. com OVA, sem adjuvante, resulta em uma significativa resposta inflamatória pulmonar alérgica, com predomínio de eosinófilos, podendo ser uma opção futura para experimentos mais próximos ao modelo humano, tanto na fase aguda, como na fase crônica da doença.

Palavras-chave: asma, alergia, camundongo e ovalbumina

ABSTRACT

Introduction: Animal models studies of asthma have been criticized because of some limitations. Protocols with features and remote results of human asthma are widely used, mainly because of the need to use adjuvant and intraperitoneal administration of allergens for sensitization.

Aims: We have tested alternative protocols using animal models of acute and chronic asthma, with features closer to human disease, using OVA without adjuvant.

Methods: Adult female BALB/c mice were used and divided into groups according to sensitization with OVA. The acute model used two doses of OVA subcutaneously (s.c.) without adjuvant, on days 0 and 7, and after intranasal (i.n.) challenge for consecutives three days, compared with a standard protocol using three doses of OVA for sensitization. The chronic model also used OVA s.c. for sensitization, adjuvant-free, on days 0 and 14, and after i.n. challenge, 3 times a week, for consecutives eight weeks. Total (TCC) and differential cell counts from bronchoalveolar lavage (BAL) and histopathology of the lungs were performed 24 hours after the last OVA challenge.

Results: In the two models of protocols studied, acute and chronic, we have observed similar allergic pulmonary response between the groups. Cell counts and histological analysis of lung tissue showed no significant difference between groups.

Conclusion: the use of sensitization with OVA s.c., with no adjuvant, resulted in an expected allergic pulmonary response, with predominant eosinophils. These protocols may be a future option to animal models of asthma closer to the human disease, both in the acute and chronic patterns.

Key words: asthma, allergy, mice and ovalbumin

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, caracterizada por hiperresponsividade brônquica e limitação ao fluxo aéreo, com elevada prevalência e morbidade, resultando em importante impacto econômico em todo o mundo.¹⁻³ A presença e atividade eosinofílica e de linfócitos Th-2, associado à produção de IgE alérgeno-específica são as principais características da doença.⁴⁻⁶

Os modelos animais têm sido utilizados há mais de 100 anos para melhor entendimento da fisiopatogenia e escolha de novos tratamentos de inúmeras doenças humanas. O modelo murino é o mais amplamente utilizado em estudos de asma há algumas décadas devido ao baixo custo, fácil manipulação e genética detalhadamente conhecida. Camundongos são animais facilmente sensibilizados a diversos antígenos, incluindo a ovalbumina (OVA), uma proteína encontrada no ovo capaz de produzir elevadas quantidades de IgE e causar uma importante resposta pulmonar alérgica.⁷ No entanto, os protocolos atualmente utilizados para a sensibilização dos animais têm recebido críticas, tanto por apresentar alguns fatores “artificiais”, quanto por ter resultados, em terapias testadas em modelos murinos, que se mostraram não eficazes quando testada em asma em humanos.⁸

Nos modelos de asma classicamente utilizados, atualmente, as principais limitações levantadas são a sensibilização através da via i.p. e com uso de adjuvante (hidróxido de alumínio - alum), o uso de protocolos somente agudos e a utilização de OVA como alérgeno, antígeno este não relacionado causalmente a asma em humanos. Classicamente, camundongos da linhagem BALB/c são expostos à OVA

i.p. para sensibilização, em um intervalo de 14 dias, com alum, seguido de desafio i.n. com OVA por 3 dias consecutivos.⁹ Mais recentemente, modelos de asma crônica tem sido explorados e testados, com exposições intranasais por aproximadamente 8 semanas. Estes têm sido os protocolos mais utilizados na literatura, mas o uso do adjuvante tem sido uma das críticas mais fortes devido ao uso de um método muito artificial para potencializar a resposta pulmonar alérgica.⁹⁻¹¹ A busca de modelos animais com protocolos mais semelhantes à doença em humanos, e com características mais abrangentes, potencialmente permitirá entender melhor os mecanismos de doença e tornar os testes pré-clínicos mais eficazes.

Assim, o objetivo do presente estudo é buscar alternativas de protocolos com modelos animais de asma aguda e crônica que apresentem características mais próximas do modelo humano e, portanto, menos artificiais. Realizamos então experimentos para estudar modelos tanto agudos quanto crônicos, testando a sensibilização s.c. dos animais, sem a utilização de alum, e comparando com outros protocolos utilizados classicamente em estudos prévios.

MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com idade de 8 semanas, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em gaiolas,

alimentados com ração e água, submetidos à fotoperíodos de 12 horas claro/12 horas escuro e mantidos em condições ideais de temperatura. Para o modelo agudo foram utilizados 34 camundongos, divididos em 6 grupos. No modelo crônico, foram utilizados 18 animais, divididos em 3 grupos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Divisão dos grupos e número de animais utilizados nos protocolos agudos, de acordo com a sensibilização (via de administração, número de doses e utilização ou não de adjuvante).

Grupos	Número de animais (n=34)
1 – OVA s.c. 3X (0,7 e 14) sem alum	6
2 – OVA s.c. 2X (7 e 14) sem alum	6
3 – OVA s.c. 2x (7 e 14) com alum	6
4 – SF 0,9% - Ctle -	4
5 – OVA i.p. 2x (0 e 14) sem alum	6
6 – OVA i.p. 2x (0 e 14) com alum – Ctle +	6

OVA: ovalbumina; sc: subcutâneo; ip: intraperitoneal, Ctle: controle, alum: hidróxido de alumínio

Tabela 2- Divisão dos grupos estudados e número de animais utilizados no modelo crônico, de acordo com a sensibilização (via de administração, número de doses e utilização ou não de adjuvante).

Grupos	Número de animais (n=18)
1. OVA i.p. (0 e 14) + Alum – Ctle +	7
2. OVA s.c. (0 e 14)	7
3. SF 0,9 % s.c. (0 e 14) – Ctle -	4

OVA: ovalbumina; sc: subcutâneo; ip: intraperitoneal, Ctle: controle, Alum: hidróxido de alumínio

Sensibilização e desafio intranasal com OVA

Protocolo agudo

O primeiro grupo em estudo recebeu a sensibilização com OVA (grau V, Sigma, USA) nos dias 0, 7 e 14, por via s.c., livre de adjuvante. Outros dois grupos foram sensibilizados por via s.c., recebendo no dia 0 apenas solução fisiológica 0,9% e OVA nos dias 7 e 14, com um grupo livre de adjuvante e o outro grupo com alum. Para o controle negativo, apenas solução fisiológica 0,9% foi utilizada como sensibilização nos dias 0, 7 e 14. Nos últimos dois grupos, os animais foram sensibilizados com OVA, via i.p. (dias 0 e 14), na dose de 20 µg, diluída em 200 µl de DPBS, sendo um grupo livre de adjuvante e outro utilizando 1 mg de alum (controle positivo).

O desafio i.n. foi sempre realizado sob anestesia geral com isoflurano em câmara anestésica, para aspiração pulmonar da solução de OVA. O desafio i.n. foi realizado após 11 dias da última sensibilização, durante três dias consecutivos, por via i.n., com OVA (100 µg, diluída em 50 µl de DPBS). O grupo controle negativo recebeu apenas solução fisiológica 0,9% por via i.n. (Figura 1).

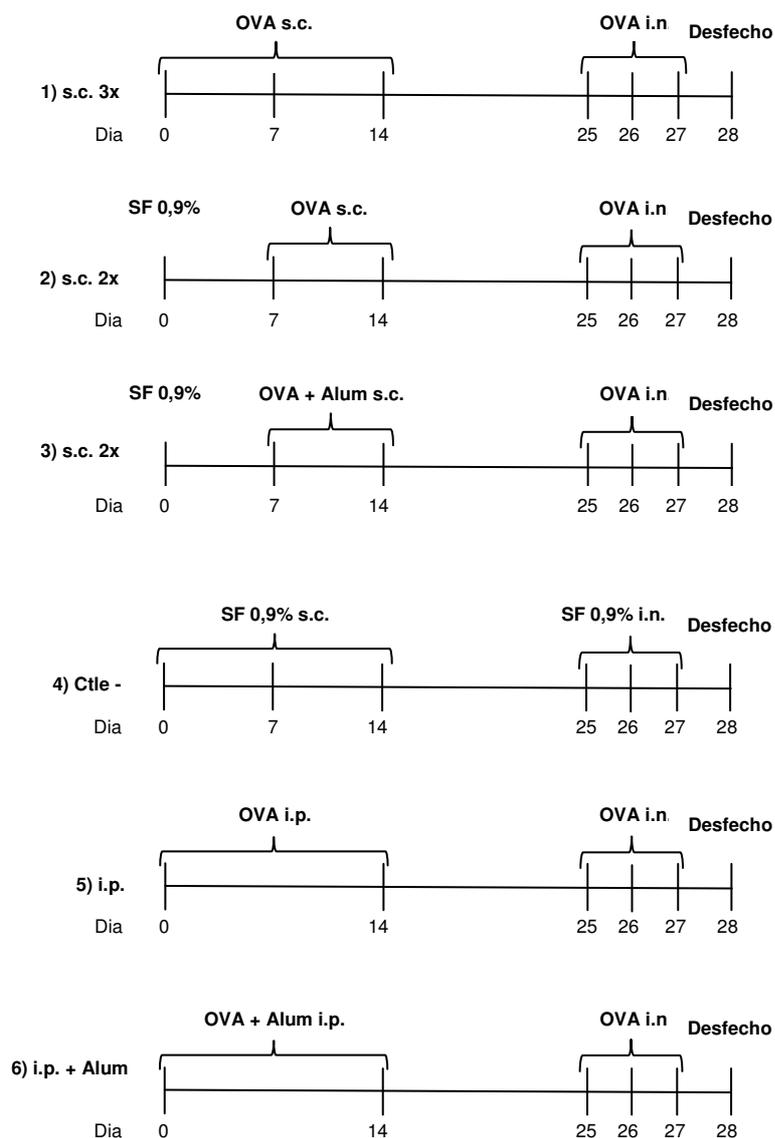


Figura 1 - Protocolos utilizados para indução de reposta inflamatória aguda em pulmões de camundongos BALB/c fêmeas. OVA: ovalbumina; s.c.: subcutânea; i.p.: intraperitoneal; i.n.: intranasal; Ctle: Controle.

Protocolo crônico

Nos experimentos de exposição crônica ao alérgeno, os grupos foram submetidos a um protocolo com 11 semanas de duração. Os animais foram sensibilizados da mesma forma que o modelo agudo com OVA por via i.p. e s.c., por 2 vezes, com intervalo de 14 dias. Após uma semana da última sensibilização, foi iniciado o desafio i.n. com OVA, 3 vezes por semana, durante 8 semanas. Durante o período de sensibilização, o primeiro grupo recebeu OVA e alum por via i.p., com intervalo de 14 dias (controle positivo). O segundo grupo recebeu apenas OVA s.c., livre de adjuvante, no mesmo período e o terceiro grupo recebeu solução fisiológica 0,9%, por via s.c., com intervalo de 14 dias (controle negativo). Os dois primeiros grupos realizaram o desafio i.n. com OVA na dose de 40 µg de OVA diluída em 50µl de DPBS, 3 vezes por semana, por 8 semanas, e o terceiro grupo recebeu apenas SF 0,9% nos mesmos dias (Figura 2).

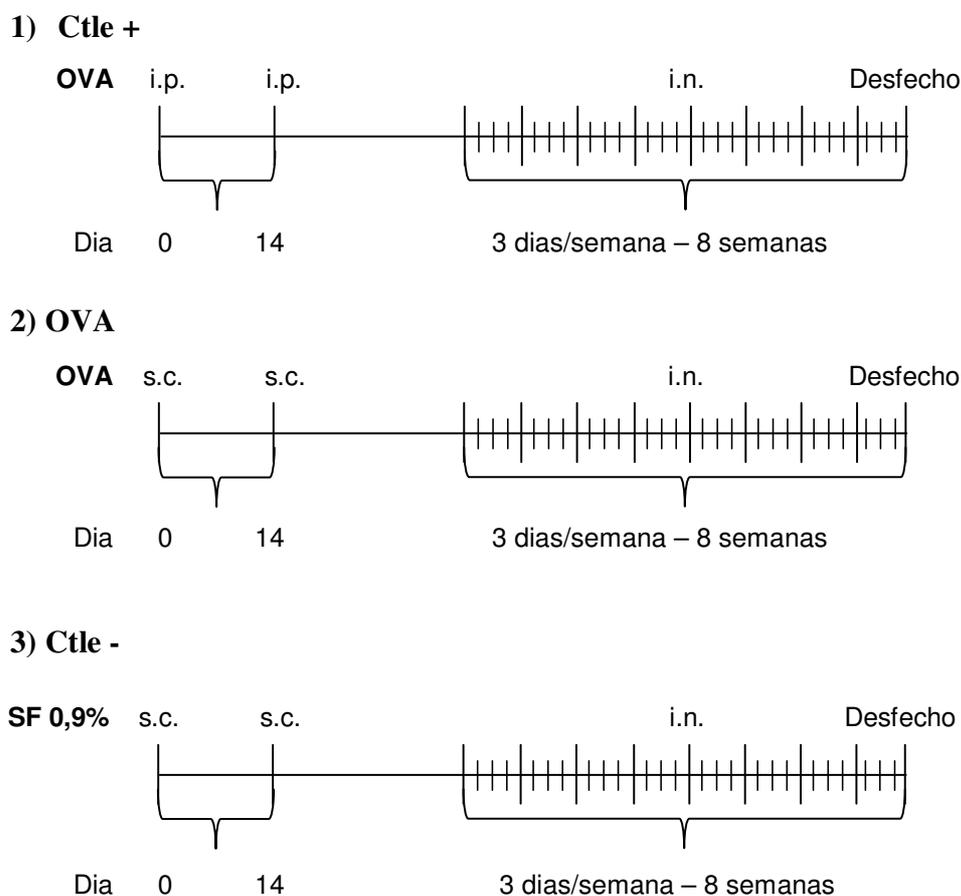


Figura 2 - Protocolos utilizados para indução de reposta pulmonar alérgica crônica em camundongos BALB/c fêmeas. OVA: ovalbumina; s.c.: subcutânea; i.p.: intraperitoneal; i.n.: intranasal; Ctle: Controle.

Lavado broncoalveolar (LBA)

Foi realizado LBA em todos os animais no final do protocolo experimental. O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100mg/ml) e cetamina (100mg/ml), proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml). Uma solução de DPBS (1 mL) foi instilada por via

intratraqueal, e aspirada logo após, por 3 vezes consecutivas. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais dos fármacos utilizados para anestesia (dose: 0,3 ml, i.p.) e descartados de acordo com as normas da instituição.

Contagem total de células e exame citológico diferencial do LBA

A amostra do LBA foi pesada e centrifugada a 4 C° (1500 rpm, por 10 minutos). O precipitado foi suspenso com 1 mL de DPBS. Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo de viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão de azul de tripan, em câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em citocentrífuga (30g, por 5 minutos). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, após coloração com May-Grünwald-Giemsa. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico foram expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

Análise histopatológica

Após a realização do LBA, foi realizada a remoção dos pulmões e instilada formalina tamponada a 10% através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e vermelho de picrossirius, para análise morfológica e de depósito de colágeno, respectivamente, em microscópio óptico. Uma avaliação

qualitativa da presença de resposta inflamatória brônquica foi realizada, bem como contagem do número de eosinófilos em um campo (3 brônquios diferentes), para classificação de gravidade da inflamação eosinofílica.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS, versão 17.0. Para os dois modelos inicialmente realizamos a análise descritiva das variáveis. Tanto no modelo agudo, como no crônico, observamos que os dados seguiam um padrão de distribuição normal, sendo então utilizado teste paramétrico de ANOVA, com análise *post-hoc* de Tukey, para aquelas comparações que atingiram significância estatística. O nível de significância estabelecido foi de 0,05. Como desfecho principal, utilizamos a contagem, atividade e presença de eosinófilos no pulmão dos animais, por ser considerada uma das células efetoras principais do sistema imune na inflamação brônquica da asma.

O cálculo do tamanho amostral foi de 6 animais por grupo no modelo agudo e 7 no modelo crônico. Este cálculo foi baseado em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de $0,7 \times 10^6$ cél/ml, com desvio padrão de $\pm 0,34$, um valor de $p=0,05$, e poder de 80%, com diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

Aspectos éticos

O estudo foi realizado a partir de normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), preconizando a utilização do menor número de animais e manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia. Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA/PUCRS).

RESULTADOS

Nosso estudo foi realizado em fase aguda e crônica da resposta pulmonar alérgica em camundongos, utilizando o modelo tradicional (controle positivo), para comparar com outros grupos de novos protocolos.

No modelo agudo, a média do retorno do LBA de todos os animais foi de 0,56 ml (DP: 0,20) e a viabilidade celular média foi de 91%. A média de eosinófilos do LBA no grupo controle negativo foi de 2,5% (DP: 2,59), e no controle positivo foi de 40,16% (DP: 9,16). Ao analisarmos a contagem total de células, observamos diferença significativa apenas em relação ao grupo 3, quando comparados aos demais ($p < 0,02$). Na contagem diferencial das células, novamente obtivemos diferença apenas em relação ao grupo 3. A contagem de macrófagos apresentou diferença desse grupo em relação aos grupos 2 ($p = 0,021$) e 5 ($p = 0,010$), e a contagem de

linfócitos apenas não mostrou diferença do grupo 3 quando comparado ao grupo 1. Em relação a contagem de neutrófilos, observamos diferença significativa do grupo que utilizou OVA s.c. + alum em relação aos grupos 2 ($p=0,017$), 4 ($p=0,004$) e 5 ($p=0,024$). Por fim, a contagem de eosinófilos apresentou diferença significativa novamente desse grupo quando comparado a todos os demais (Figura 3). Os grupos que utilizaram OVA s.c. sem o uso de adjuvante apresentaram uma resposta inflamatória pulmonar semelhante ao controle positivo (OVA ip + Alum), inclusive o grupo que utilizou o protocolo mais curto de 21 dias (grupo 2), com OVA s.c., livre de adjuvante.

A análise histológica do modelo agudo demonstrou infiltrado inflamatório moderado a intenso, com predomínio de linfócitos e presença de mais de 100 eosinófilos em região peribrônquica por campo, em todos os grupos estudados. O controle negativo apresentou anatomia preservada, sem alterações inflamatórias, característico de animais saudáveis (Figura 4).

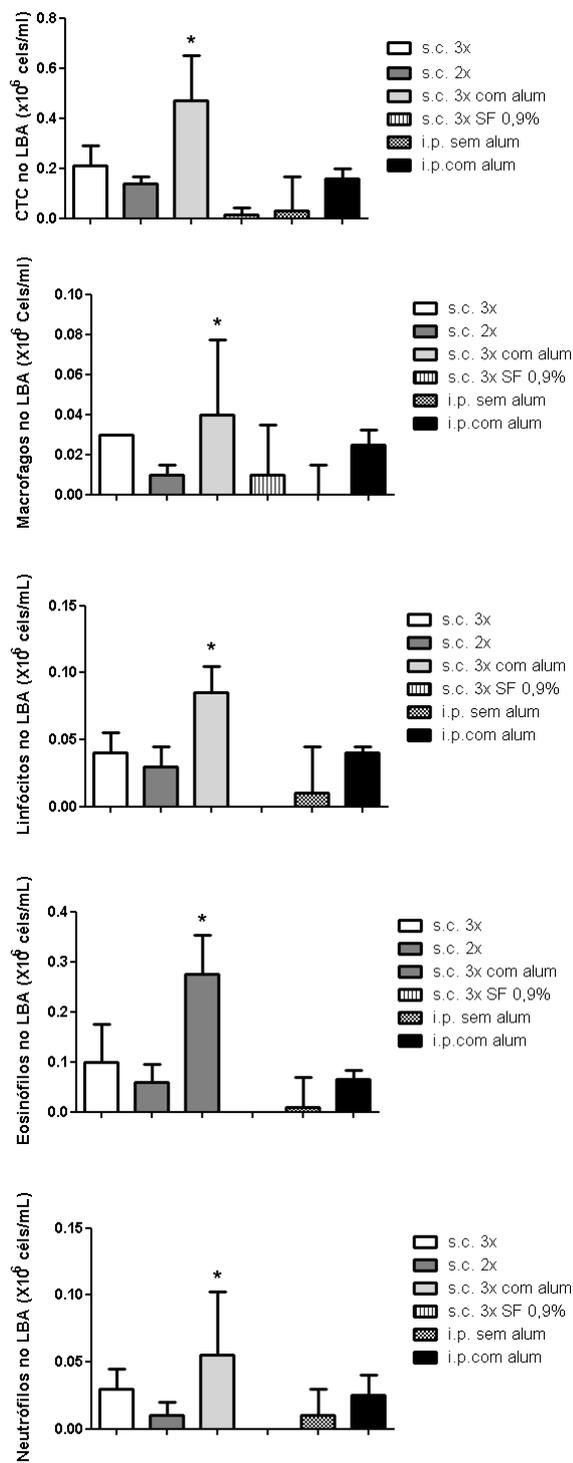


Figura 3 – Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados no modelo agudo. Foi utilizado o teste ANOVA, com *post-hoc* de Tukey. * $p < 0,05$.

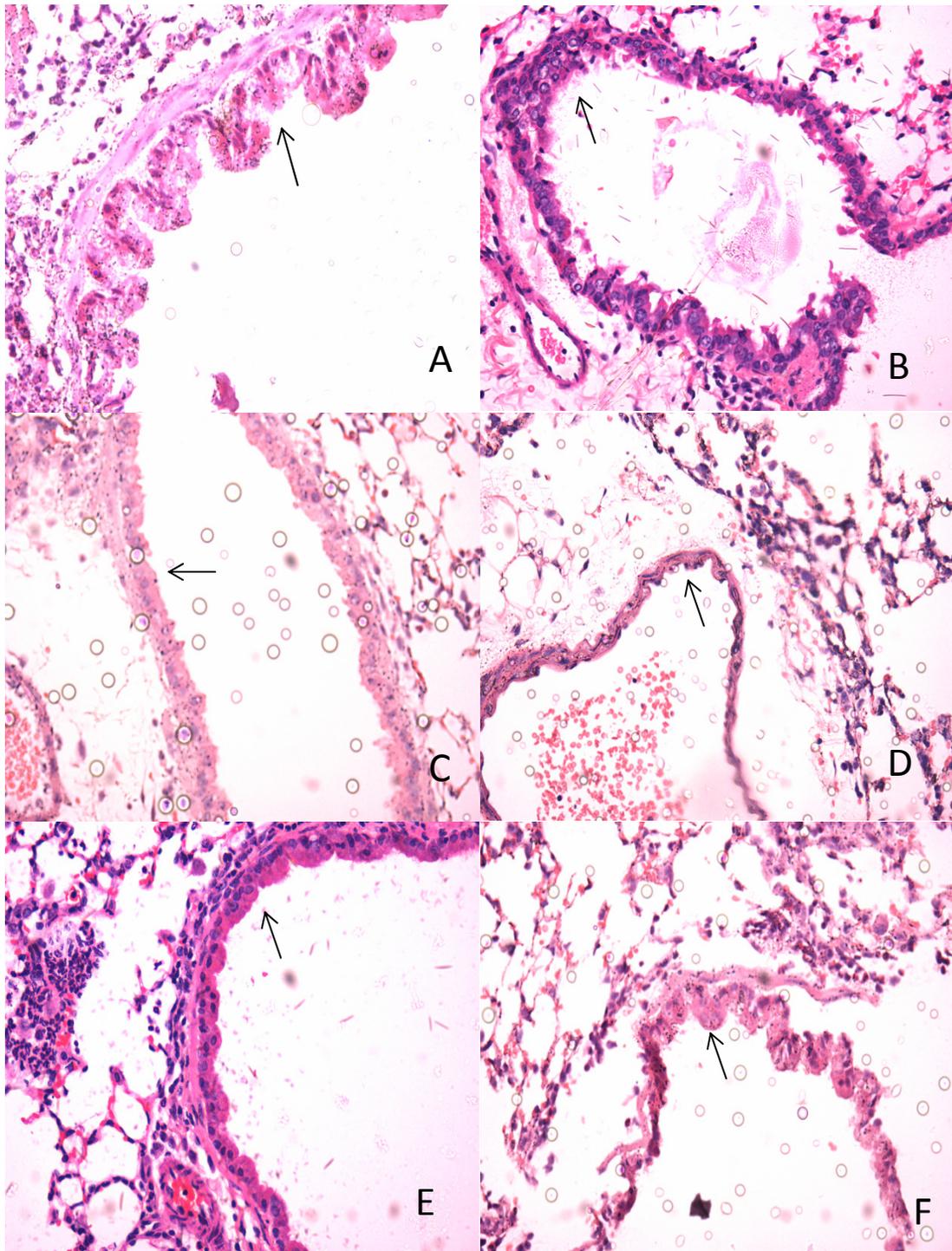


Figura 4 - Análise histológica dos grupos de camundongos estudados. Presença de intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular (em A, B, C, E e F) em todos os grupos sensibilizados. A histologia dos pulmões dos animais com exposição apenas à SF 0,9% (Controle negativo, Quadro D) apresenta brônquios com paredes de espessura normal. (400X, coloração HE).

No modelo crônico, a média do retorno do LBA de todos os animais foi de 0,6 ml (DP: 0,15). A média de eosinófilos do grupo controle negativo foi de 1,75% (DP: 1,48), e no controle positivo foi de 37,71% (DP: 6,21). Ao analisarmos a contagem total de células não observamos diferença significativa quando comparamos o controle positivo com o grupo que foi sensibilizado com OVA s.c. e livre de adjuvante. Da mesma forma, quando analisamos o número de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos observamos uma resposta inflamatória semelhante para os dois grupos. Esses resultados estão dispostos na Figura 5.

A análise histológica do protocolo crônico demonstrou infiltrado pulmonar moderado a intenso, com predomínio de linfócitos e eosinófilos. Além disso, foi possível observar a presença de fibrose do tecido pulmonar nos dois grupos estudados e deposição de colágeno na parede das vias aéreas. Alguns animais do grupo controle negativo apresentaram leve infiltrado pulmonar, porém mantendo anatomia preservada e contagem celular compatível com animais saudáveis (Figura 6).

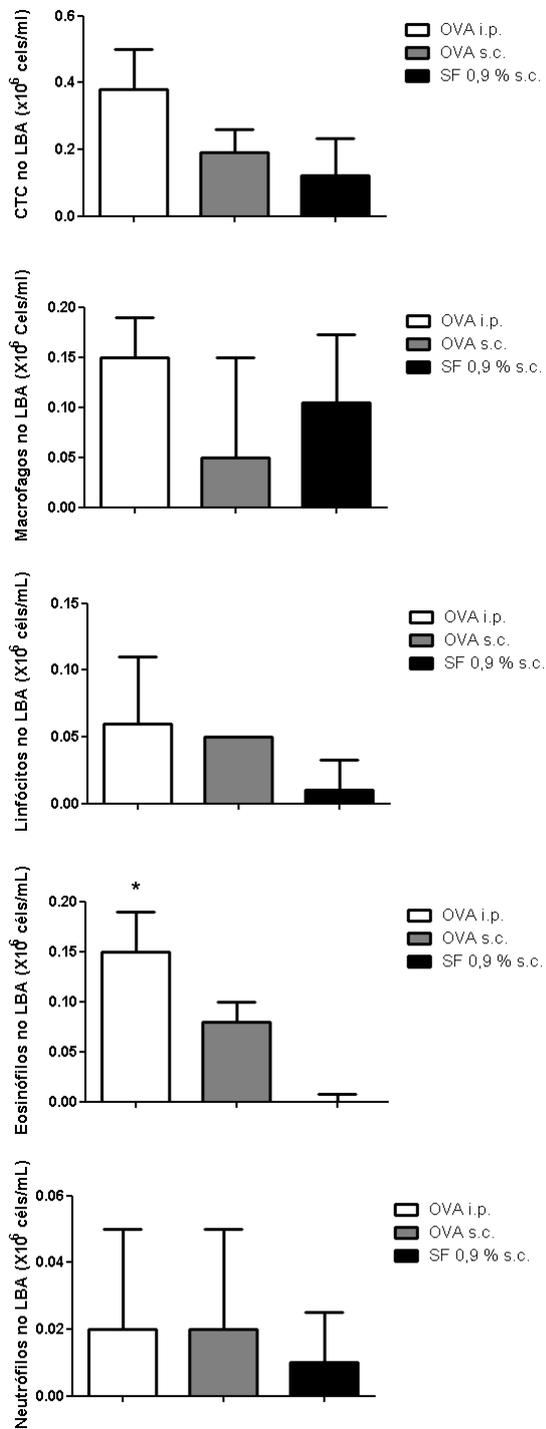
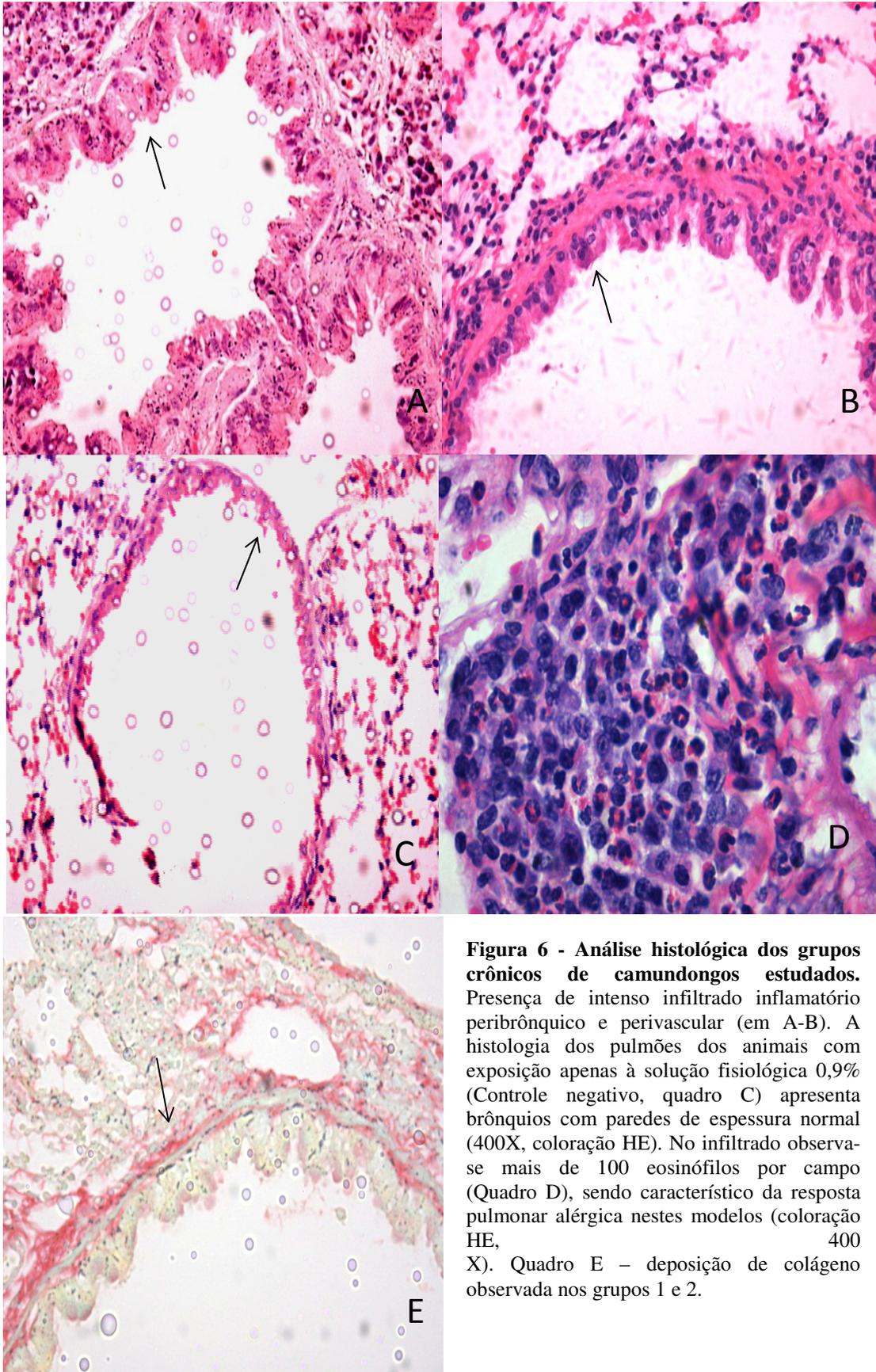


Figura 5 – Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados no modelo crônico. Foi utilizado o teste ANOVA, com *post-hoc* de Tukey. * $p < 0,05$.



DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos principalmente a influência do uso de adjuvante na resposta pulmonar alérgica e da rota de sensibilização (s.c. x i.p.) em diferentes períodos de sensibilização. Demostramos que a busca de protocolos alternativos para estudo de modelos animais em asma aguda e crônica pode ser realizada de forma menos artificial e mais próxima à doença em humanos. Ao compararmos diferentes grupos de camundongos BALB/c sensibilizados com OVA através da via s.c., observamos a mesma resposta pulmonar alérgica quando utilizamos a via i.p.. Além disso, o uso de adjuvante parece não ser necessário e essencial para desencadear uma resposta eosinofílica no pulmão de camundongos.

Resultados relevantes puderam ser confirmados através dessa pesquisa. No modelo agudo, o uso da via s.c. sem a utilização de adjuvante desencadeou uma resposta semelhante ao modelo tradicionalmente utilizado, sensibilizando os animais com OVA via i.p., juntamente com alum. Além disso, observamos que um protocolo mais curto, com duração de 21 dias, pode gerar uma resposta pulmonar alérgica significativa, facilitando a realização de testes pré-clínicos, particularmente em um cenário de pesquisa da indústria farmacêutica, reduzindo os custos e a duração dos experimentos.

O uso de alum como adjuvante tem sido bastante criticado, por ser uma substância que induz artificialmente a produção de citocinas pro-inflamatórias, provocando uma ativação robusta de linfócitos Th-2.⁹⁻¹¹ Em um estudo realizado por Conrad e colaboradores, publicado em 2009, pode-se observar que não houve

diferença significativa em relação à contagem de células no LBA, análise da histologia pulmonar e níveis de interleucinas (IL-5, IL-10 e IL-13), utilizando sensibilização s.c. com OVA, sem adjuvante.¹³ Conseguimos reproduzir em parte os resultados deste estudo, porém com apenas 2 sensibilizações e utilizando um protocolo um pouco mais curto, obtendo resultados semelhantes aos publicados por esses autores, deixando ainda mais claro que é possível realizar protocolos de menor duração e principalmente mais próximos ao modelo humano.

Além disso, desenvolvemos nesse estudo um protocolo para o aspecto crônico da asma. Esse tem sido um tema muito discutido devido à ausência da resposta pulmonar alérgica nos animais nessa fase da doença. Algumas alterações como remodelamento brônquico, caracterizado pela presença de fibrose subepitelial, hiperplasia de células caliciformes e hipertrofia da musculatura lisa, são características persistentes encontradas na fase crônica da doença em humanos.¹⁴⁻¹⁶ Os modelos animais crônicos envolvem exposição ao antígeno por um período de 8 semanas ou mais, mas o desafio de longa duração pode induzir uma tolerância imunológica com o uso da OVA, caracterizada pela inibição posterior da inflamação no pulmão dos animais expostos ao antígeno por longos períodos.¹⁷⁻¹⁹ Sabe-se que o modelo murino sensibilizado com OVA responde inicialmente ao desafio inalado, no entanto, com o seguimento do protocolo, o animal se torna “tolerante” ao alérgeno.^{16, 20, 21} Desse modo, a resposta inflamatória é reduzida tornando os protocolos crônicos inadequados para avaliação da lesão do tecido pulmonar na fase crônica da asma.²² A indução de tolerância pode estar relacionada com a influência do uso de adjuvante, devendo-se ter especial atenção com os resultados encontrados. Em nosso estudo

podemos perceber que o grupo que recebeu sensibilização s.c. com OVA sem uso de adjuvante apresentou uma resposta inflamatória semelhante ao grupo que utilizou OVA i.p. com uso de alum, sendo assim dispensável o uso desta substância. Além disso, suspeita-se também que a inibição da resposta inflamatória pode ser causada pelo tipo de alérgeno utilizado, devendo, portanto, substituir o uso de OVA por alérgenos mais próximos ao modelo humano. Jordana et al. realizaram um estudo utilizando ácaro de poeira doméstica e observaram que 9 semanas após a exposição ao alérgeno a inflamação das vias aéreas apresentava-se totalmente resolvida, enquanto mantinham-se características de remodelamento brônquico e hiper-reatividade das vias aéreas.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Quanto ao modelo crônico, devemos observar a resposta dos animais algumas semanas após o desafio i.n., a fim de perceber se as características da doença crônica permanecem. Além disso, devem-se realizar outros estudos com alérgenos próximos ao modelo humano, como a poeira doméstica, para que os resultados possam ter maior validade em testes pré-clínicos. Já no modelo agudo, poderíamos ter testado protocolos ainda mais curtos que facilitem os estudos pré-clínicos, reduzindo custos, tempo dos experimentos e, além disso, seguindo preceitos éticos de menor tempo de exposição dos animais e consequentemente menor sofrimento.

Concluindo, novos modelos de asma aguda, sem uso de adjuvante, mostraram uma resposta inflamatória pulmonar significativa, com predomínio de eosinófilos, podendo ser uma opção futura para experimentos mais próximos ao modelo humano. Protocolos mais curtos também podem ser desenvolvidos, a fim de facilitar as

pesquisas nesta área. Além disso, os modelos crônicos apresentaram sinais característicos de depósito de colágeno na via aérea, semelhante a um dos aspectos do remodelamento brônquico. Entretanto, estes protocolos devem ser futuramente estudados após algumas semanas do término da exposição, para que possamos observar se essas características são mantidas a longo prazo da mesma maneira como observamos em humanos. Por fim, a utilização desses protocolos deve ser validada em testes pré-clínicos utilizando fármacos conhecidos para o tratamento da asma e consolidando assim sua validade na pesquisa experimental desta importante doença.

REFERÊNCIAS

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Archives of disease in childhood*. 2000;82 Suppl 2:II2-5. Epub 2000/06/02.
 2. Fischer GB, Camargos PA, Mocelin HT. The burden of asthma in children: a Latin American perspective. *Paediatric respiratory reviews*. 2005;6(1):8-13. Epub 2005/02/09.
 3. Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, Barreto ML. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy*. 2009;64(1):5-17. Epub 2008/12/17.
 4. Tisiologia SBdPe. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo de Asma. *J Bras Pneumol*. 2006;32(7):S447-S74.
 5. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease models & mechanisms*. 2008;1(4-5):213-20. Epub 2008/12/19.
 6. Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005;35(10):1251-3. Epub 2005/10/22.
 7. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2007;37(7):973-88. Epub 2007/06/22.
 8. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma - chances beyond ovalbumin. *Current drug targets*. 2008;9(6):495-502. Epub 2008/06/10.
 9. Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(10):1572-5. Epub 2008/07/23.
 10. Shapiro SD. Animal models of asthma: Pro: Allergic avoidance of animal (model[s]) is not an option. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(11):1171-3. Epub 2006/11/18.
 11. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. 1999;163(12):6448-54. Epub 1999/12/10.
 12. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of immunological methods*. 1985;83(2):209-15. Epub 1985/11/07.
-

13. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kilic A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2009;39(8):1246-54. Epub 2009/05/15.
 14. Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;112(2):474-88. Epub 2006/06/09.
 15. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews*. 2006;86(1):245-78. Epub 2005/12/24.
 16. Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002;27(3):267-72. Epub 2002/09/03.
 17. Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, et al. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *The American journal of pathology*. 1999;154(6):1911-21. Epub 1999/06/11.
 18. Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(2 Pt 1):627-35. Epub 2000/02/15.
 19. Jungsuwadee P, Benkovszky M, Dekan G, Stingl G, Epstein MM. Repeated aerosol allergen exposure suppresses inflammation in B-cell-deficient mice with established allergic asthma. *International archives of allergy and immunology*. 2004;133(1):40-8. Epub 2003/12/03.
 20. Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, Subrata LS, Thomas JA, Turner DJ, et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(12):2649-60. Epub 2006/11/08.
 21. Andrew DK, Schellenberg RR, Hogg JC, Hanna CJ, Pare PD. Physiological and immunological effects of chronic antigen exposure in immunized guinea pigs. *International archives of allergy and applied immunology*. 1984;75(3):208-13. Epub 1984/01/01.
 22. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current drug targets*. 2008;9(6):485-94. Epub 2008/06/10.
-