



PEDRO LEME SILVA

**IMPACTO DO REMODELAMENTO DA VIA AÉREA E
PARÊNQUIMA PULMONAR NA MECÂNICA
RESPIRATÓRIA EM MODELO MURINO DE ASMA
ALÉRGICA GRAVE**

Dissertação submetida à Pós-graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**IMPACTO DO REMODELAMENTO DA VIA AÉREA E PARÊNQUIMA
PULMONAR NA MECÂNICA RESPIRATÓRIA EM MODELO MURINO
DE ASMA ALÉRGICA GRAVE**

PEDRO LEME SILVA

ORIENTADORA: PATRICIA RIEKEN MACEDO ROCCO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

APROVADA POR:

Prof^ª. Patricia Rieken Macedo Rocco, Ph.D - Orientadora
Prof^ª. Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Prof. Marcia Capela, Ph.D
Prof^ª Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Prof^ª Patricia Gardino, Ph.D
Prof^ª Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Prof^ª. Carmen Pazos Moura, Ph.D
Prof. Adjunto, IBCCF^o, UFRJ

Prof^ª. Doris Rosenthal, Ph.D - Revisora
Prof^ª. Adjunta, IBCCF^o, UFRJ

Rio de Janeiro

Dezembro de 2006

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Investigação Pulmonar e Fisiologia da Respiração do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro na vigência de auxílios concedidos pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT, PRONEX-FAPERJ).

DEDICATÓRIA

A Deus, o grande responsável pela paz e pela esperança presentes na minha vida.

Aos meus pais, Aloísio e Rita, que sempre me apoiaram com muito amor e carinho.

Aos meus avós Luís e Lourdes, João e Nadir (*in memoriam*), pelos momentos felizes pelos quais compartilhamos.

À minha tia Mônica, pela sua inspiração e coragem de seguir em frente.

À Ana Beatriz, por ter me proporcionado momentos inesquecíveis e me ensinado a enxergar a vida com olhos serenos.

AGRADECIMENTOS

Existem algumas pessoas que contribuíram para a elaboração desta tese e para muitas das conquistas pessoais e profissionais da minha vida, eu devo meu agradecimento a essas pessoas.

- Prof^a Patrícia Rocco, minha orientadora. Meu sincero agradecimento pela oportunidade, pela confiança, pela preocupação, pelo incentivo e, sobretudo, pelo exemplo de perseverança, competência, dedicação e amor à pesquisa. Você é uma pessoa admirável.

- Prof. Walter Araújo Zin, por ser um pesquisador exemplar, pelos ensinamentos de fisiologia respiratória e principalmente pela amizade.

- Prof^a Vera Capelozzi e Prof^a Marisa Dolhnikoff, pelas análises de microscopia eletrônica e densidade eosinofílica, respectivamente.

- Prof. Marcelo Bozza, pela análise do fluido do lavado broncoalveolar.

- Prof^a Doris Rosenthal, pela revisão da tese.

- Caroline, Viviane e Andréa, pela parceria preciosa e satisfatória. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigado por tudo.

- Cristiane Nascimento, o extremo cuidado e a dedicação com que realiza todos os seus trabalhos são um exemplo. Muito obrigado por todos os conhecimentos compartilhados. Obrigado pela sua amizade, ajuda e carinho.

- Alba, Lilian, Flávia, Mariana Genuíno, Débora, Gisele, Halina, Sheila, Paula, Andréa, Maria Cristina, Simone, Letícia, Mônica, companheiras queridas do Laboratório. Obrigado pelo carinho, cooperação e pela convivência agradável. Poder contar sempre com vocês foi muito bom para mim.

RESUMO

SILVA, Pedro Leme. O IMPACTO DO REMODELAMENTO DA VIA AÉREA E PARÊNQUIMA PULMONAR NA MECÂNICA RESPIRATÓRIA EM MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA GRAVE. Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre, Rio de Janeiro, 2006.

Introdução: A patologia da asma grave continua pouco compreendida já que os dados fisiológicos e patológicos sugerem que as modificações inflamatórias existem não somente nas vias aéreas centrais como também nas periféricas.

Objetivo: O objetivo do estudo é desenvolver um modelo murino de asma alérgica grave (SA) com características histológicas e ultraestruturais similares à asma grave humana e investigar o impacto de tais modificações na mecânica respiratória.

Métodos: No grupo SA, os camundongos BALB/c foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina. O grupo controle recebeu salina utilizando o mesmo protocolo. Para entender o impacto do remodelamento pulmonar em presença de constrição da via aérea e unidades contráteis do parênquima, um outro grupo de animais (grupo MA) foi submetido ao mesmo protocolo do grupo SA, mas estes receberam metacolina (agente broncoconstritor) intravenosa imediatamente antes do experimento. A histologia pulmonar (microscopias óptica e eletrônica), análise quantitativa de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e a mecânica pulmonar *in vivo* (pressões resistivas e viscoelásticas e elastância estática) e *in vitro* (elastância e resistência teciduais e histeresividade) foram avaliados. **Resultados:** O grupo SA demonstrou infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar e vias aéreas, metaplasia de células mucosas, fibrose nas vias aéreas e parênquima pulmonar e um aumento nos níveis de citocinas no BALF. As pressões resistiva e viscoelástica, elastância estática e elastância tecidual foram maiores nos grupos SA e MA do que no grupo controle.

Conclusão: Esse modelo de asma alérgica grave nos possibilitou acessar diretamente o papel da inflamação e remodelamento da via aérea e parênquima pulmonar na mecânica respiratória.

Contagem de Palavras: 273

Palavras chave: Mecânica tecidual, colágeno, microscopia eletrônica, asma

Rio de Janeiro
Dezembro de 2006

ABSTRACT

SILVA, Pedro Leme. THE IMPACT OF AIRWAY AND LUNG PARENCHYMA REMODELING IN RESPIRATORY MECHANICS IN A MURINE MODEL OF SEVERE ALLERGIC ASTHMA Orientadora: Patricia Rieken Macedo Rocco

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre, Rio de Janeiro, 2006.

Background: The pathology of severe asthma remains poorly understood since physiologic and pathologic data suggest that inflammatory changes exist not only in the large airways but also in the lung periphery.

Objective: The aim of this study is to develop a murine model of severe allergic asthma (SA) with some major histological and ultrastructural features of severe human asthma and investigate the impact of such changes in the respiratory mechanics.

Methods: In the SA group, BALB/c mice were sensitized with ovalbumin and exposed to repeated ovalbumin challenges. The control group received saline using the same protocol. To better understand the role of airway and lung parenchyma remodeling after bronchoconstriction in respiratory mechanics, another group of animals (MA group) was submitted to the same protocol as SA mice but in addition received methacholine intravenously just before the experiment. Lung histology (light and electron microscopy), quantitative analysis of collagen and elastic fibers in the airways and lung parenchyma, cellular profile and amounts of IL-4, IL-5, and IL-13 in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and *in vivo* (resistive and viscoelastic pressures, and static elastance) and *in vitro* (tissue elastance, resistance, and hysteresivity) lung mechanics were evaluated.

Results: The SA group showed eosinophilic infiltration of the lung tissue and airways, mucus cell metaplasia, fibrosis in the airways and lung parenchyma, and an increase in the amounts of cytokines in the (BALF). Resistive and viscoelastic pressures, static elastance, and tissue elastance were higher in the SA and MA than in the control group.

Conclusions: This model of severe allergic lung inflammation enabled us to directly assess the role of airway and lung parenchyma inflammation and remodeling in respiratory mechanics.

Word count: 273

Key Words: asthma, collagen, electron microscopy, lung mechanics, resistance, eosinophil, cytokines, mouse

Rio de Janeiro

Dezembro de 2006

PREFÁCIO

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas ...
Que já têm a forma do nosso corpo ...
E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos
mesmos lugares ...

É o tempo da travessia ...
E se ousarmos fazê-la ...
Teremos ficado ... para sempre ...
À margem de nós mesmos...”

Fernando Pessoa

ÍNDICE

Capa.....	ii
Agência Financiadoras.....	iii
Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Prefácio.....	viii
Índice	ix - xi
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas.....	xiii
Abreviaturas	xiv-xvi
Introdução.....	01
1. Considerações Gerais.....	02
1.2 Características Clínicas da Asma Grave.....	03
1.3 Modificações Patológicas e Histopatológicas.....	05
1.3 a) Desacoplamento epitelial e espessamento da membrana basal	06
1.3 b) Hiperplasia da glândula mucosa.....	06
1.3 c) Fibrose subepitelial	07
1.3 d) Elastólise e fragmentação de fibras elásticas	07
1.3 e) Infiltrado de células inflamatórias	07
1.3 f) Hiperplasia/hipertrofia da musculatura lisa brônquica	08
1.4 Modelos Murinos de Inflamação Pulmonar Alérgica.....	09
1.5 Interação Via aérea-parênquima Pulmonar.....	10
2. Justificativa.....	12
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4. Materiais e Métodos.....	17

4.1 Animais utilizados.....	18
4.2 Preparo dos Animais para análise da mecânica <i>in vivo</i>	20
4.3 Preparo dos Animais para análise da Hiperresponsividade Brônquica.....	27
4.4 Preparo dos Animais para análise da Mecânica <i>in vitro</i>	27
4.5 Determinação dos Parâmetros Mecânicos Teciduais.....	30
4.6 Análise Histológica (Morfometria e Celularidade).....	31
4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	35
4.8 Análise do Fluido do Lavado Broncoalveolar.....	37
4.9 Análise Estatística.....	37
5. Resultados.....	39
5.1 Parâmetros Morfométricos.....	40
5.2 Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF).....	43
5.3 Fibras Colágenas e Elásticas.....	45
5.4 Modificações ultrastruturais e histológicas no modelo murino de asma alérgica grave.....	45
5.5 Microscopia Eletrônica	47
5.6 Mecânica Respiratória <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	49
5.7 Hiperresponsividade Brônquica.....	51
5.8 Correlação entre os Parâmetros Funcionais e Morfométricos.....	53
6. Discussão.....	55
7. Conclusão.....	64
8. Referências.....	66

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 1. Prevalência mundial da asma	3
Figura 2. Respostas inflamatórias e remodelamento na asma com ativação da junção epitélio-mesênquima	8
Figura 3. Representação esquemática temporal do protocolo experimental.	18
Figura 4. Organograma do experimento.....	18
Figura 5. Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume e pressão traqueal em função do tempo.....	24
Figura 6. Montagem experimental da mecânica <i>in vivo</i>	26
Figura 7. Montagem experimental para medida da mecânica tecidual	29
Figura 8. Retículo para quantificação dos parâmetros morfométricos.....	32
Figura 9. Fotomicrografias representativas de vias aéreas e parênquima pulmonar.....	42
Figura 10. Microscopia eletrônica do bronquíolo terminal e espaço alveolar.....	48
Figura 11. Hiperresponsividade da via aérea de camundongos BALB/c após a exposição crônica de salina ou OVA.....	52

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Parâmetros morfométricos.....	41
Tabela 2. Contagem de células e citocinas no fluido lavado broncoalveolar	44
Tabela 3. Modificações ultraestruturais e histológicas no modelo murino de inflamação pulmonar alérgica grave.....	46
Tabela 4. Parâmetros da mecânica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	50
Tabela 5. Correlação entre os parâmetros fisiológicos e morfométricos	54

ABREVIATURAS

θ - ângulo de fase

δ - densidade de massa da solução Krebs-Henseleith

η - histeresividade

ω - velocidade angular

$\Delta\varepsilon$ - variação de deslocamento

$\Delta\sigma_i$ - variação ciclo a ciclo na força

ΔE - variação de elastância

ΔF - variação de força

σ_i - força instantânea

ΔP - variação de pressão

A_0 - área de seção basal

A_i - área de seção transversa instantânea

BALF - fluido de lavado broncoalveolar

C – grupo controle

CI - índice de constrição

CRF - capacidade residual funcional

E – elastância tecidual

Edyn - elastância dinâmica do pulmão

Est - elastância estática do pulmão

FB - força basal

H - área de histerese da curva força-deslocamento

H&E – Hematoxilina e Eosina

IgE – Imunoglobulina E

IL - interleucina

Ip – intraperitoneal

L₀ - comprimento basal

L_B – comprimento final

Li - comprimento instantâneo

MA - grupo de asma alérgica grave submetido à injeção de metacolina (3000 µg/kg)

N - força

NI - número de interceptos

NP - número de pontos

ORF - método de resorcina-fucsina de Weigert modificado com oxidação

OVA - ovalbumina

P - pressão

PEEP - pressão positiva ao final da expiração

Pi - pressão pulmonar no ponto de inflexão

PI e PII - pneumócitos tipos I e II, respectivamente

Pmáx - Pressão máxima ou de pico inspiratória

Ptr - pressão traqueal

R - resistência

Req - resistência do equipamento

SA – grupo de inflamação pulmonar alérgica grave

solução K-H - solução de Krebs-Henseleith modificada

Th - linfócito T helper

T_i - tempo inspiratório

V' - fluxo

VEF_1 - volume expiratório forçado no primeiro segundo

V_T - volume corrente

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas, associada à obstrução ao fluxo aéreo e hiperresponsividade brônquica. Entretanto, essas características podem variar de acordo com a gravidade asmática. Embora a terapia farmacológica existente seja capaz de controlar a maioria dos sintomas da asma, existe um subgrupo de pacientes asmáticos que apresentam uma baixa resposta ao tratamento convencional, tem altas taxas de morbidade e uma piora na qualidade de vida (BARNES, 1998).

Atualmente, aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo têm asma, sendo que a prevalência desta doença aumenta em cerca de 50% a cada década (MASOLI *et al.*, 2004). As prevalências são altas (>10%) em países desenvolvidos e, apesar de dados deficitários (incluindo muitos dados provenientes da África), as taxas estão crescendo em regiões em desenvolvimento tão logo se tornam mais industrializadas (MASOLI *et al.*, 2004) (Figura 1).

Tanto nos países do leste europeu como nos países em desenvolvimento, os pacientes com asma grave são responsáveis por aproximadamente 50% dos custos governamentais econômicos diretos e indiretos, apesar dessa população representar somente 10 a 20% da população total com asma (BEASLEY, 2002; GODARD *et al.*, 2002; WENZEL, 2005). Tendo em vista o impacto da asma grave nos custos de saúde e a necessidade de compreender seus mecanismos fisiopatológicos iniciou-se um estudo multicêntrico na Europa (ENFUMOSA). Com o objetivo de coletar, através de uma grande amostra de pacientes, dados confiáveis acerca do fenótipo da asma grave. Com base nesse estudo, identificou-se que a asma grave possui características clínicas distintas, que variam de sua forma leve a moderada, tendo como principais características: sintomas persistentes, testes de função pulmonar

alterados apesar do uso de altas doses de medicamentos, inflamação neutrofílica, liberação de mediadores inflamatórios e pouca associação com atopia.

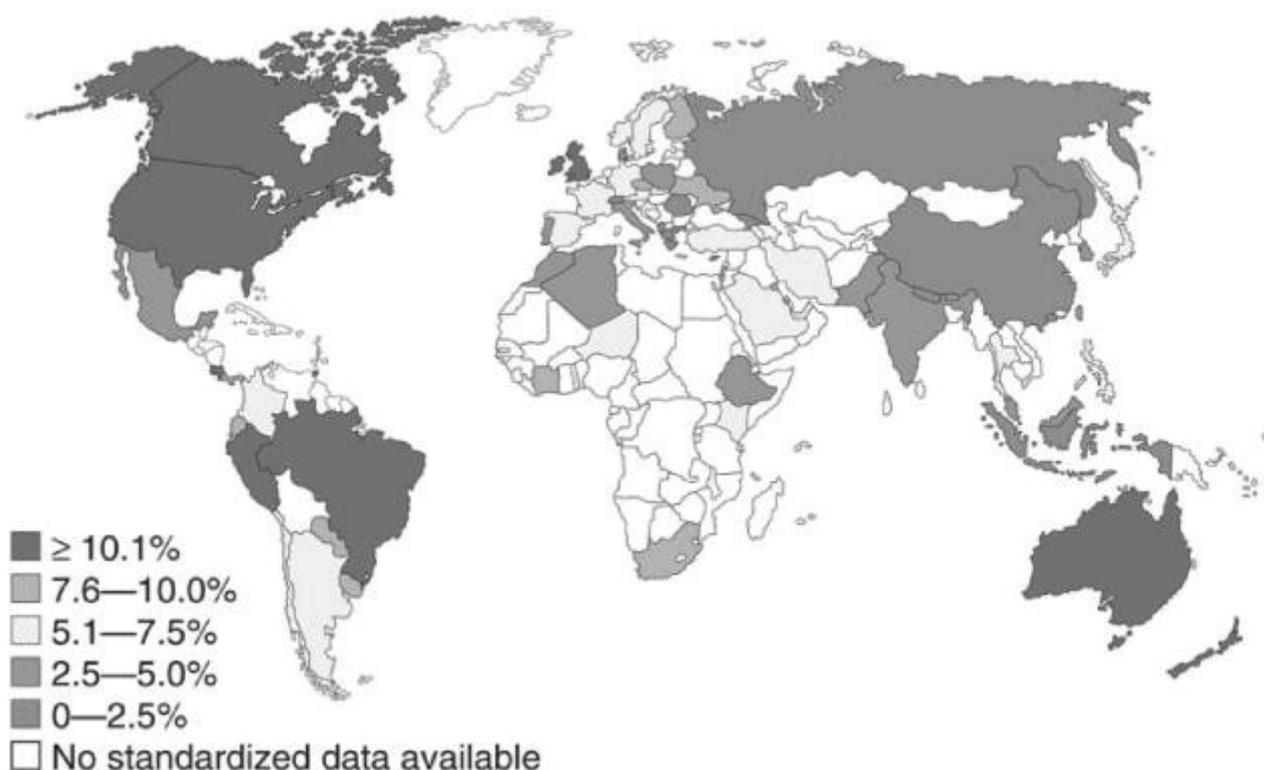


Figura 1. Prevalência mundial da asma (MASOLI *et al.*, 2004).

1.2 Características Clínicas da Asma Grave

A asma grave apesar de afetar um pequeno percentual da população asmática (aproximadamente 10%), permanece como uma doença frustrante já que esses pacientes continuam com o tratamento deficitário e, com isso, propensos a graves exacerbações. Tem sido identificado que esses indivíduos são mais predispostos a internações de emergência, ou hospitalares, do que os asmáticos leves e moderados (SERRA-BATLLES *et al.*, 1998). A introdução de potentes corticosteróides inalatórios teve um importante impacto na sobrevivência de pacientes dependentes de corticosteróides orais, porém os resultados perduram controversos

em função da heterogeneidade da doença (NOONAN *et al.*, 1995). Sendo a asma uma doença complexa com diferentes fenótipos e alta variabilidade clínica, vem sendo necessário traçar uma definição que possa incorporar senão todos, a maioria dos critérios para a asma grave.

Surpreendentemente, pouco se sabe acerca do desenvolvimento da asma grave. Até o momento, há diversos pontos que necessitam ser elucidados como, por exemplo: estaria a asma grave relacionada a fatores genéticos e ambientais, ou um evento agudo induziria alterações ultraestruturais irreversíveis nas vias aéreas e no parênquima pulmonar que contribuiriam para a gravidade da doença ? Não se sabe se qualquer paciente com asma pode vir a desenvolver asma grave, ou se somente um pequeno subgrupo de pacientes estaria propenso. Atualmente, os estudos longitudinais têm analisado principalmente o VEF₁ (volume expiratório forçado em 1,0 segundo), a fim de identificar e estratificar a gravidade da asma, porém esse parâmetro possui baixa correlação com os sintomas da doença (TEETER *et al.*, 1998).

No passado, todos os casos de asma eram considerados similares, diferindo somente na gravidade, que se baseava na necessidade do paciente utilizar esteróide e agonista β 2-adrenérgico com maior frequência e maiores doses. Entretanto, com a identificação dos fenótipos da asma grave e a variabilidade clínica na sua apresentação, essa visão vem sendo modificada. Vários são os fenótipos da asma grave: asma eosinofílica ou não-eosinofílica, asma intrínseca ou extrínseca, e a asma sensível à aspirina. Estudos patológicos de asma grave sugerem que 50% a 66% dos pacientes com asma grave possuem infiltrado eosinofílico nas vias aéreas de grande calibre, apesar do uso de altas doses de corticosteróide sistêmico ou oral. Os pacientes com asma grave e com aumento do número de eosinófilos no muco,

no fluido do lavado broncolaveolar e no tecido (biópsia) apresentam piora funcional (VEF₁ reduzido) e maior propensão a exacerbações clínicas, em comparação com o subgrupo de pacientes sem eosinófilos (WENZEL *et al.*, 1999; PAYNE *et al.*, 2001; TEN BRINKE *et al.*, 2001).

Recentemente, essa diferença fenotípica tem sido atribuída ao momento em que a asma grave se inicia, isto é, na fase precoce ou tardia da doença (MIRANDA *et al.*, 2004). A eosinofilia persistente parece ser mais prevalente na fase tardia da asma, independente da dose de corticosteróides. Na fase precoce da doença, o aumento no número de eosinófilos está associado à presença de linfócitos T e mastócitos já na doença de início tardio, há a presença somente de eosinófilos com pouca evidência de envolvimento de qualquer outro tipo celular.

1.3 Modificações Patológicas e Histopatológicas

Ao longo das duas últimas décadas, têm sido identificadas vias alérgicas fundamentais, com uma participação de um importante subtipo de células T (designadas células Th2), que produzem citocinas e quimiocinas relacionadas à regulação de imunoglobulina E (IgE) e a maturação, recrutamento, disparo e ativação de mastócitos, basófilos e eosinófilos. As vias alérgicas que contribuem para a disfunção das vias aéreas na asma leve e moderada são sensíveis à ação dos corticosteróides. Já na forma mais grave, o padrão inflamatório se modifica, com a participação de neutrófilos e evidente destruição tecidual e remodelamento das vias aéreas (JATAKANON *et al.*, 1999; HAMILTON *et al.*, 2003). As vias aéreas na asma grave exibem características de lesão crônica com evidência de injúria e reparo teciduais. Entretanto, a patologia da asma grave continua pouco compreendida, principalmente devido às limitações na aquisição de tecido pulmonar (WENZEL, 2005), já que os resultados fisiológicos e patológicos sugerem que as modificações

inflamatórias ocorrem na periferia do pulmão (CARROLL *et al.*, 1997; DE MAGALHÃES SIMOES *et al.*, 2005). A histologia da asma grave é caracterizada por várias modificações estruturais, incluindo:

- a) Desacoplamento epitelial e espessamento da membrana basal (KAY, 1996) – O espessamento e lesão da superfície epitelial, bem como a presença de células com intensa atividade mitótica, são freqüentes nos pacientes que vieram a falecer de ataque asmático, tendo asma grave como doença de base. Acredita-se que as proteínas derivadas do eosinófilo, juntamente com as espécies reativas de oxigênio e proteases, podem contribuir para a fragilidade do epitélio. Além disso, os pacientes com asma grave e eosinofilia persistente possuem a membrana basal reticular mais espessa, em comparação com indivíduos normais, pacientes com asma leve e aqueles com asma sem eosinofilia (WENZEL *et al.*, 1999; MIRANDA *et al.*, 2004). Essa fragilidade epitelial, aliada ao espessamento da membrana reticular, pode vir a resultar no desacoplamento epitelial que, por sua vez, é um achado clássico, principalmente em pacientes que faleceram após ataque asmático.
- b) Hiperplasia da glândula mucosa (QUTAYBA, 2003) – Essa modificação pode ser encontrada tanto nas vias aéreas proximais como também nas vias aéreas distais de pacientes com asma grave (AIKAWA *et al.*, 1992). Com a hiperplasia/hipertrofia da glândula mucosa e células caliciformes ocorre aumento na produção de muco com a obstrução de vias aéreas de médio e pequeno calibres, contribuindo para a limitação de fluxo aéreo e o aprisionamento de ar na asma grave.
- c) Fibrose subepitelial – Nos últimos cinco anos, tem sido sugerido que a diminuição progressiva e aparente da função pulmonar nas formas mais graves da asma seria causada por modificações estruturais ou remodelamento nas vias aéreas e do parênquima pulmonar. Em um estudo de biópsias pulmonares de pacientes com asma grave, constatou-se deposição de fibras colágenas e acúmulo de fibroblastos nas vias aéreas (BENAYOUN *et al.*, 2003). As fibroses subepitelial e alveolar

provavelmente estão relacionadas com a piora funcional progressiva observada nos pacientes com asma grave.

- d) Elastólise e fragmentação de fibras elásticas (MAUAD *et al.*, 1999) – A relação entre estrutura e função na asma tem sido muito estudada. Sabe-se que, todos os compartimentos da via aérea têm sido relacionados a alguma alteração estrutural que pode vir a acarretar modificações funcionais (ROBERTS, 1995). As fibras elásticas fornecem suporte para manter a via aérea aberta e retorná-la à posição de repouso. Mauad e colaboradores (MAUAD *et al.*, 1999) demonstraram, em autópsias de pacientes que vieram a falecer de ataque asmático, que tanto a elastólise, quanto a fragmentação das fibras elásticas estão presentes nas vias aéreas, indicando que o sistema de fibras elásticas pode participar no remodelamento e no mecanismo de broncoconstrição.
- e) Infiltrado de células inflamatórias (DE MAGALHÃES SIMÕES *et al.*, 2005) – Pouco se sabe sobre a distribuição da inflamação nas vias aéreas de pacientes com asma grave. Estudos realizados com fibroscopia somente coletaram amostras proximais, sendo que o lavado broncoalveolar não é específico, pois inclui todas as células das vias aéreas proximais e distais. Em um recente estudo, analisou-se o padrão inflamatório de toda a árvore traqueobrônquica, em tecidos de autópsia, e constatou-se uma distribuição difusa de eosinófilos desde a mucosa nasal até as porções pulmonares distais. A participação da via aérea distal no processo inflamatório da asma tem ganhado bastante interesse, já que essa região parece atuar na perpetuação da inflamação, uma vez que a maioria dos medicamentos utilizados para a terapia da asma não consegue alcançar as vias aéreas distais (LEACH *et al.*, 1998).
- f) Hiperplasia/hipertrofia da musculatura lisa brônquica (SEOW *et al.*, 1998) – A quantidade e/ou o formato das fibras de músculo liso está aumentada nas vias aéreas de pacientes com asma grave está aumentada. Por exemplo, pacientes que vieram a falecer de asma apresentaram hipertrofia nos músculos lisos das vias

áreas de grande e pequeno calibre (JAMES *et al.*, 1989). Nesse contexto, vários estudos têm sugerido que a principal diferença entre a asma leve e grave é a quantidade de músculo liso presente nas vias aéreas proximais (BENAYOUN *et al.*, 2003).

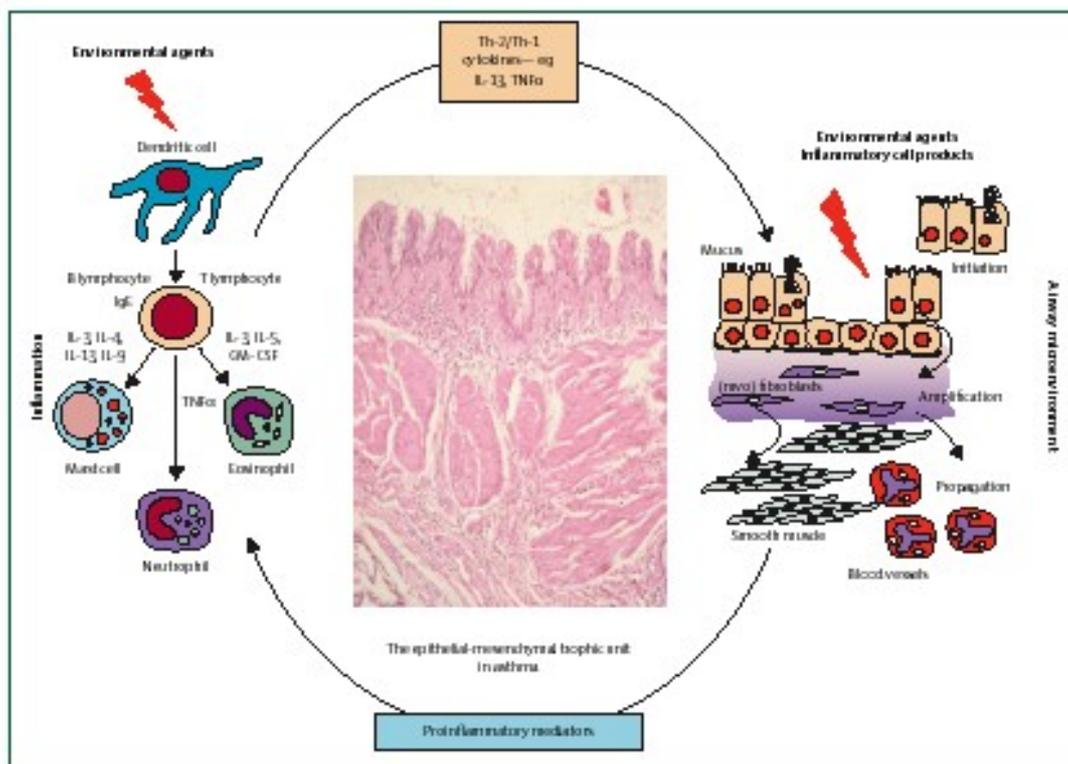


Figura 2. Respostas inflamatórias e remodelamento na asma com ativação da junção epitélio-mesênquima. A lesão epitelial altera a comunicação entre o epitélio brônquico e as células mesenquimais sobrepostas, levando a uma ativação dos miofibroblastos, aumento da espessura da membrana basal e indução de modificações estruturais da parede da via aérea (HOLGATE *et al.*, 2006).

1.4 Modelos Murinos de Asma Alérgica

Os modelos murinos de asma alérgica são úteis para examinar os mecanismos básicos da inflamação alérgica e a subsequente resposta imunológica (KUMAR *et al.*, 2002). Um modelo ideal de asma brônquica deve mimetizar o maior número possível de características da doença humana incluindo: altos níveis de imunoglobulinas específicas a alérgenos; inflamação da via aérea caracterizada pelo influxo de células T; eosinófilos e neutrófilos; desenvolvimento de hiperresponsividade de via aérea, e remodelamento crônico das vias aéreas com deterioração na função pulmonar. Em camundongos, a exposição ao alérgeno induz a produção de determinadas imunoglobulinas específicas com o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade cutânea imediata. Além disso, após repetidas exposições há acúmulo de eosinófilos e hiperresponsividade de vias aéreas a estímulos não específicos, tais como metacolina (CIESLEWICZ *et al.*, 1999; NEUHAUS-STEINMETZ *et al.*, 2000). A metacolina é um potente broncoconstritor que atua nos receptores muscarínicos localizados na musculatura lisa das vias aéreas levando a uma obstrução ao fluxo aéreo. Entretanto, o nível da resposta imune Th2 depende largamente da linhagem do camundongo, da via de administração do alérgeno, sua dose e frequência de exposição.

Os camundongos BALB/c são conhecidos por apresentarem aumento de IgE quando expostos a diferentes alérgenos, enquanto os camundongos C57BL/6 e SJL possuem uma produção de IgE intermediária e baixa, respectivamente. Os camundongos BALB/c, quando expostos a ovalbumina (OVA), apresentam aumento no número de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar, como também elevada produção de interleucina 4 (IL-4), IL-5 e TNF- α . Além disso, o camundongo BALB/c demonstra maior grau de hiperreatividade das vias aéreas em comparação ao camundongo C57BL/6, indicando que o mesmo alérgeno causa diferentes fenótipos que dependem dos pré-requisitos genéticos. Logo, a gravidade da inflamação e a função pulmonar variam entre as diferentes linhagens (HERZ *et al.*,

1998).

Vários fatores influenciam diretamente a qualidade e a quantidade da resposta imunológica ao alérgeno, sendo que diferenças no protocolo podem ter efeitos drásticos no desenvolvimento do fenótipo asmático em camundongos. O modo de administração do alérgeno tem um importante impacto na qualidade da resposta imunológica. O alérgeno pode ser administrado tanto por nebulização quanto por instilação intratraqueal ou, ainda, por aplicação intranasal. Tais protocolos resultam em uma indução máxima e reprodutível de uma resposta imunológica inflamatória nas vias aéreas, juntamente com o desenvolvimento de hiperresponsividade brônquica (HERZ *et al.*, 2004).

1.5 Interação via aérea-parênquima pulmonar

A relação entre estrutura e função na asma tem sido muito estudada. As alterações nas vias aéreas e no parênquima pulmonar observadas na asma contribuem para as modificações funcionais (ROBERTS, 1995). Os principais constituintes da matriz extracelular pulmonar incluem: fibras colágenas e elásticas, e proteoglicanos cujas características são importantes para o estabelecimento das propriedades mecânicas dos tecidos e das vias aéreas. Entre essas moléculas, a mais abundante e, talvez a mais importante para a integridade estrutural, é o colágeno.

Tem sido observada deposição subepitelial de fibras colágenas I, III e V na lâmina reticular, mesmo em casos de asma leve (ROCHE *et al.*, 1989). Além disso, as fibras elásticas têm um papel importante no processo de remodelamento das vias aéreas de indivíduos com asma, podendo contribuir para o mecanismo de

broncoconstrição (MAUAD *et al.*, 1999). Entretanto, não há consenso na literatura sobre as modificações das fibras elásticas e colágenas nas vias aéreas de pacientes com asma grave. Em um estudo descritivo, Bousquet e colaboradores (BOUSQUET *et al.*, 1996) demonstraram fragmentação e diminuição de fibras elásticas na camada subepitelial de biópsias brônquicas de pacientes com asma grave. Por outro lado, Godfrey e colaboradores (GODFREY *et al.*, 1995) não conseguiram demonstrar diferenças no conteúdo total de fibras elásticas nas vias aéreas de pacientes com asma, leve e grave, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Diversos fatores podem contribuir para a hiperresponsividade da via aérea na asma grave (BRADLEY *et al.*, 1991; JEFFERY *et al.*, 1992). Tem sido proposto que essa modificação funcional pode resultar em redução da retração elástica das vias aéreas (BOUSQUET *et al.*, 1996), perda do epitélio e eosinofilia mucosa. Adicionalmente, tem sido proposto que as modificações da matriz extracelular do parênquima pulmonar, bem como as modificações ultraestruturais na asma grave, têm importante participação na acentuação da hiperresponsividade das vias aéreas (ADLER *et al.*, 1998; RAMOS-BARBON *et al.*, 2004).

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

A asma grave atinge um pequeno percentual da população de indivíduos com asma (aproximadamente 10%). Entretanto, em função da terapia farmacológica não ser eficaz e desses pacientes estarem propensos a exacerbações, eles contribuem desproporcionalmente com elevados custos para o sistema governamental de saúde (WENZEL, 2005). A patologia da asma grave continua pouco compreendida, principalmente, devido às limitações na obtenção de amostras teciduais (WENZEL, 2005), já que os dados fisiológicos e patológicos sugerem que as modificações também existem na periferia do pulmão (CARROL *et al.*, 1997; DE MAGALHAES *et al.*, 2005). A histopatologia da asma grave é caracterizada por numerosas modificações estruturais, incluindo: desacoplamento epitelial e espessamento da membrana basal reticular (KAY, 1996), hiperplasia de glândula mucosa (QUTAYBA, 2003), fibrose subepitelial (QUTAYBA, 2003), elastólise e fragmentação de fibras elásticas (MAUAD *et al.*, 1999), infiltração de células inflamatórias (DE MAGALHAES SIMOES *et al.*, 2005), hipertrofia/hiperplasia de músculo liso brônquico (SEOW *et al.*, 1998) e modificações vasculares (QUTAYBA, 2003). Entretanto, a maioria dessas modificações patológicas nas vias aéreas asmáticas somente foi investigada *postmortem* (KAY, 1996) e o impacto dessas alterações na função pulmonar ainda necessita ser melhor elucidada.

Os modelos murinos de asma alérgica provaram ser úteis na avaliação dos mecanismos básicos de inflamação alérgica e da resposta imunológica subsequente (KUMAR *et al.*, 2002). Na maioria dos modelos animais, a ovalbumina tem sido utilizada como antígeno para estudar os eventos fisiopatológicos e os mecanismos da imunomodulação experimental. Tais protocolos resultam em uma indução satisfatória e reproduzível de uma resposta inflamatória nas vias aéreas,

paralelamente com o desenvolvimento de hiperresponsividade brônquica (KUMAR *et al.*, 2002). Há poucas descrições na literatura de modelos murinos de asma alérgica grave (MUKAYAMA *et al.*, 2004; BEAVITT *et al.*, 2005) e nenhum deles mimetiza as alterações morfológicas e funcionais da asma grave humana. Ambos estudos caracterizam a asma grave em função da intensidade da reação inflamatória e responsividade de via aérea e não das modificações histopatológicas.

OBJETIVOS

3. Objetivos

Desenvolver um modelo murino de asma alérgica grave que apresente modificações histológicas, ultraestruturais e imunológicas similares a asma grave humana.

Avaliar o impacto dessas alterações morfológicas na mecânica pulmonar.

3.1 Objetivos Específicos

Dentre os objetivos específicos se destacam:

- a) Analisar a mecânica pulmonar *in vivo* e *in vitro*;
- b) Analisar a hiperresponsividade das vias aéreas;
- c) Analisar a histologia pulmonar (microscopias óptica e eletrônica);
- d) Quantificar as células eosinofílicas no tecido pulmonar;
- e) Quantificar citocinas e celularidade total e diferencial no fluido do lavado broncoalveolar.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Quarenta e seis camundongos machos BALB/c (20-25 g), oriundos do biotério do Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro foram utilizados. A fim de analisar a mecânica pulmonar *in vivo* e *in vitro*, a histologia (morfometria e celularidade) e a microscopia eletrônica, dezoito camundongos foram randomicamente divididos em dois grupos. No grupo de asma alérgica grave (SA) (n = 6), os animais foram imunizados, através de um protocolo que consistia de injeções intraperitoneais de 10 µg ovalbumina estéril (OVA) em 0.1 mL de salina nos primeiros 14 dias durante 7 dias alternados. Quarenta dias após o início da sensibilização, 40 µg OVA em 20 µl de salina estéril aquecida foram instiladas intratraquealmente. Esse procedimento foi repetido três vezes com um intervalo de três dias entre as instilações. No grupo controle (C) (n = 6), os animais receberam salina utilizando o mesmo protocolo. Para entender o impacto da administração de um potente agente broncoconstritor (metacolina) em presença de remodelamento pulmonar, foi realizado um outro grupo de animais submetido ao mesmo protocolo do grupo asma alérgica grave, porém eles receberam injeção intravenosa de metacolina (3000 µg/kg) imediatamente antes da análise da mecânica pulmonar *in vivo* (grupo MA).

Figura 3. Representação esquemática temporal do protocolo experimental.

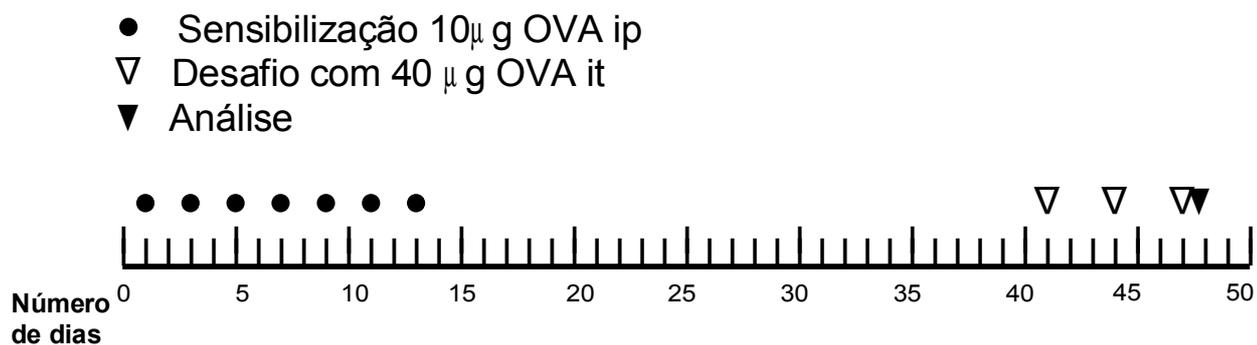
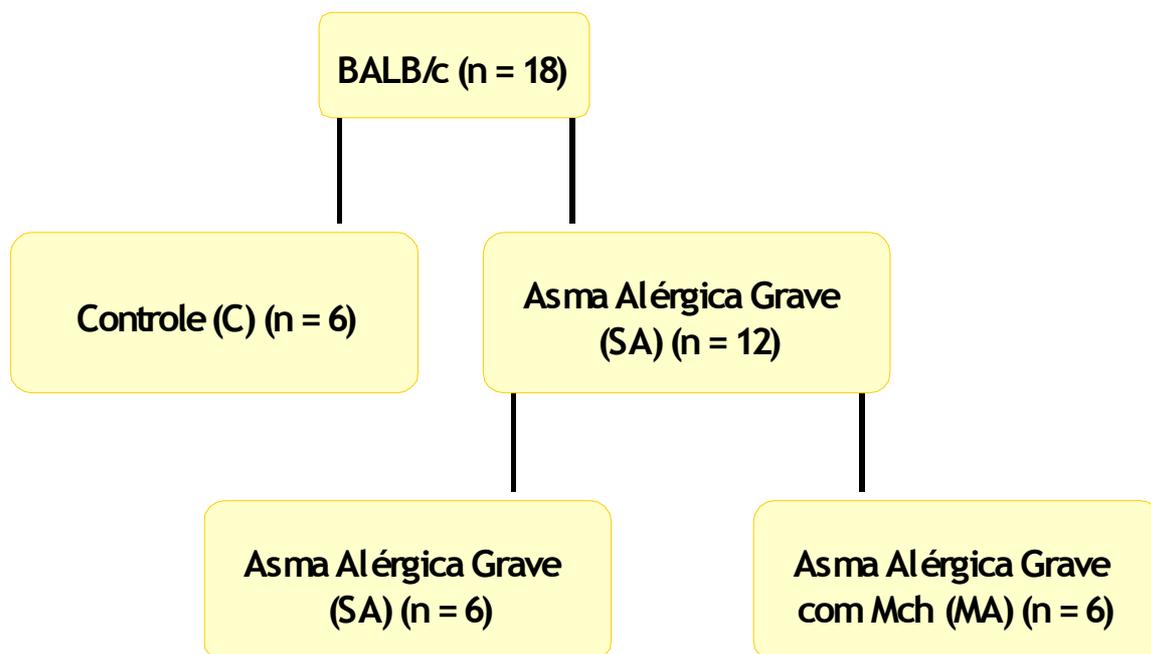


Figura 4. Organograma do experimento da mecânica pulmonar *in vivo*, *in vitro* e histologia.



Os animais permaneceram em gaiolas microisoladoras por 47 dias com o intuito de protegê-los de possíveis agentes infecciosos. Todos os camundongos foram tratados de forma similar. Adicionalmente, com o objetivo de impedir infecções pulmonares, todas as substâncias e materiais cirúrgicos foram esterilizados antes dos experimentos.

Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de cuidados e uso dos animais de laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América (*U.S. Department of Health and Human Care Services*, 1985). O projeto foi aprovado pela comissão interna do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CAUAP – Comissão de Avaliação e Utilização de Animais de Pesquisa).

A medida da mecânica respiratória e a análise da histologia por microscopia óptica foram realizadas no Laboratório de Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ), a análise do fluido do lavado broncoalveolar foi realizada no Laboratório de Microbiologia no Departamento de Microbiologia (UFRJ), e a análise da histologia por microscopia eletrônica foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 PREPARO DOS ANIMAIS PARA ANÁLISE DA MECÂNICA *IN VIVO*

Vinte e quatro horas após o último desafio de ovalbumina intratraqueal, a mecânica pulmonar foi analisada. Para o estudo funcional foram utilizados todos os seis animais de cada grupo. Os animais foram sedados [diazepam 5 mg, intraperitonealmente (i.p.)], pesados (balança Filizola, modelo BR, fabricado por Indústrias Filizola AS, SP, Brasil) e, em seguida, anestesiados com pentobarbital sódico [Hypnol[®], Cistália, Itapira, SP, Brasil (20 mg/kg, i.p.)]. Essa dose era suficiente

para manter o animal em plano anestésico (supressão do reflexo córneo-palpebral) por 1 hora, quando, então, foi administrada uma nova dose (metade da anterior) de pentobarbital sódico [Hypnol[®], Cistália, Itapira, SP, Brasil (20 mg/kg, i.p.)].

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos em abdução a 90 graus em relação ao corpo e os membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada uma pequena incisão longitudinal, medial, de aproximadamente 0,5 cm de extensão na face ventral no pescoço seguida de divulsão dos tecidos até a exposição completa do terço inicial da traquéia. A seguir, pela traqueostomia, uma cânula de polietileno (0,8 cm de diâmetro interno) foi introduzida na traquéia, sendo esta fixada na porção proximal por meio de fios de algodão. A resistência do equipamento (R_{eq}), incluindo a cânula traqueal foi constante até um fluxo (V') de $26 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ e de $0.12 \text{ cmH}_2\text{O}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{s}$. A pressão resistiva do equipamento ($= R_{eq}/V'$) foi diminuída da pressão resistiva pulmonar sendo que os presentes resultados representam as propriedades mecânicas intrínsecas.

Para o estudo da mecânica pulmonar, os animais tiveram sua musculatura paralisada após a administração intravenosa (i.v.) de brometo de vecurônio ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) e a parede torácica anterior retirada bem como o músculo diafragma, sendo portanto os pulmões e o coração expostos ao ar ambiente. Esses, por sua vez, receberam constante hidratação com salina aquecida. Imediatamente após a retirada da parede torácica, foi aplicado uma pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de $2 \text{ cm H}_2\text{O}$ com o objetivo de manter as estruturas alveolares abertas e estabilizadas. A cânula traqueal do animal foi conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais (MORTOLA *et al.*, 1983) para medida de fluxo aéreo. O pneumotacógrafo que foi utilizado consiste de uma cânula metálica com duas saídas laterais com as seguintes características: diâmetro interno = 1,5 mm, comprimento =

4,2 cm e distância entre as saídas laterais = 2,1 cm. O gradiente de pressão através do pneumotacógrafo foi determinado utilizando-se um transdutor diferencial de pressão Scireq [©SCIREQ *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá]. Essa forma de medir fluxo aéreo, além de bem simples, é adequada, visto que, em animais de pequeno porte, os fluxos baixos e as dimensões traqueais reduzidas são responsáveis pela existência de fluxo laminar e, portanto, o fluxo aéreo pode ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V' . Através de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a outro transdutor diferencial de pressão para medida da pressão traqueal (P_{tr}). A inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade da tubulação) evitou erros de medida de resistência ao fluxo (CHANG *et al.*, 1981). O volume (V_T) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

A ventilação artificial foi instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, *Universidad de la Republica*, Montevideo, Uruguai) acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Os animais foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL, fluxo aéreo de 1 mL/s, frequência respiratória de 100 irpm.

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração após insuflação com fluxo constante (BATES *et al.*, 1985, 1988, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b), que permite analisar separadamente os componentes elástico, viscoso e viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão (Figura 4). No presente estudo, como a parede torácica anterior foi retirada, somente foram analisados os componentes elásticos, viscoso e viscoelástico e/ou inomogêneo do pulmão.

Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, ocorre uma queda súbita da pressão traqueal (P_{tr}) até um ponto (ponto de inflexão, P_i) a partir do qual

o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão (P_{el}) (Figura 4). A diferença de pressão (ΔP_1) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ($P_{m\acute{a}x}$) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta (P_i), corresponde ao componente viscoso do pulmão. A segunda variação de pressão (ΔP_2), representada pela queda lenta, do P_i ao platô (P_{el}), reflete a pressão dissipada para vencer o componente viscoelástico (“stress relaxation”) e/ou inomogêneo (“pendelluft”) do tecido pulmonar (BATES *et al.*, 1988; D’ANGELO *et al.*, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b). A soma de ΔP_1 e ΔP_2 fornece a variação total de pressão (ΔP_{tot}). A elastância estática do pulmão (E_{st}) foi calculada dividindo-se a P_{el} pelo volume corrente (V_T).

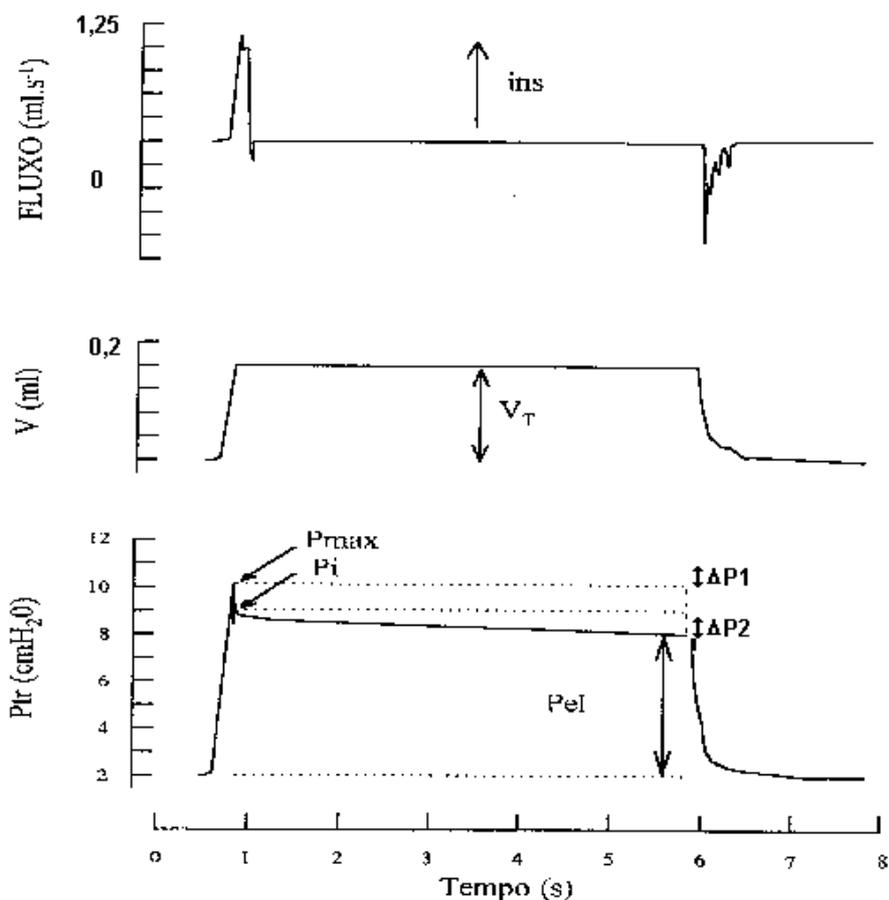


Figura 5. Representação esquemática dos traçados de fluxo, volume e pressão traqueal em função do tempo, obtidos a partir da oclusão da via aérea ao final da inspiração. P_{max} = pressão máxima alcançada, P_i = pressão no ponto de inflexão, P_{el} = pressão de retração elástica e V_T = volume corrente.

Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10 ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o fluxo nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno volume. Este fluxo será responsável pelo aumento do volume pulmonar e,

conseqüentemente, de P_i e P_{el} . Por isso, foi realizada a correção de acordo com Kochi e colaboradores (KOCHI *et al.*, 1988a).

Foram registrados 10 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração (BATES *et al.*, 1985, 1988, 1989; KOCHI *et al.*, 1988a, 1988b) em cada animal. Os transdutores conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal registraram os sinais de V' e P_{tr} , respectivamente. As respostas de freqüências dos sistemas de registro da P_{tr} foram estáveis até 20 Hz. Os sinais foram filtrados [©SCIREQ *Scientific Respiratory Equipment Inc.* (SC-24), Montreal, Canadá], convertidos a sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bits (DT-2801A, *Data Translation*, Malboro, MA, EUA), e amostrados a uma freqüência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador, utilizando-se o software LABDAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá) e gravados em disquetes magnéticos para posterior análise, que foi realizada pelo programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá) (Figura 5).

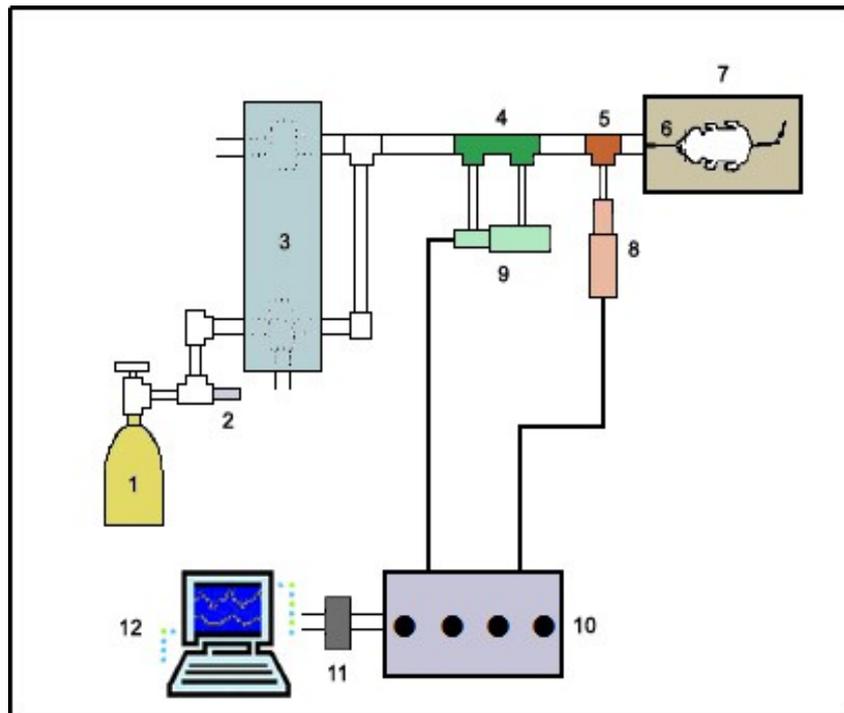


Figura 6. Montagem experimental consistindo de:

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Rotâmetro de agulha.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor de pressão traqueal.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10 – Scireq.
- 11 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 12 - Microcomputador.

4.3 PREPARO DOS ANIMAIS PARA A ANÁLISE DA HIPERRESPONSIVIDADE BRÔNQUICA

Em outro grupo de animais (grupos C e SA, n=4/cada), a hiperresponsividade de via aérea foi mensurada. Uma dose de salina seguida por doses crescentes de metacolina (3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 µg/kg) foram administradas por um cateter de polietileno inserido na veia jugular e a pressão traqueal máxima foi coletada 30 s, 1, 3, 5 e 7 minutos após a injeção de metacolina. O fluxo aéreo e a pressão traqueal foram mensurados diretamente após alcançado o aumento máximo na Ptr que seguiu a infusão intravenosa de metacolina (ARANTES-COSTA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2002; XISTO *et al.*, 2005). A resistência do sistema respiratório foi obtida através da equação de movimento do sistema respiratório: $Ptr(t) = E \cdot V(t) + R \cdot V'(t)$ onde (t) é tempo, Ptr = Pressão Transpulmonar, E = elastância, R = resistência, V = volume e V' = fluxo.

4.4 PREPARO DOS ANIMAIS PARA ANÁLISE DA MECÂNICA *IN VITRO*

Após a determinação da mecânica respiratória, heparina sódica (1000 IU) foi imediatamente injetada via venosa. Dez minutos depois, a traquéia foi clampeada, ao final da expiração, e a aorta abdominal e a veia cava foram seccionadas, levando a uma grande hemorragia que rapidamente matou os animais. Os pulmões foram removidos em bloco e tiras de tecido pulmonar, com dimensões de 1,0x0,2x0,2 cm foram retiradas da periferia do pulmão esquerdo desses animais, para evitar a presença de vasos e brônquios. As tiras de parênquima pulmonar foram imediatamente colocadas em um recipiente contendo solução de Krebs-Henseleith gelada, continuamente borbulhada com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), trocada a cada 20 minutos (SALERNO *et al.*, 1998; LOPEZ-AGUILAR *et al.*,

1998; ROCCO *et al.*, 2001).

As tiras de tecido pulmonar foram pesadas, e seus comprimentos iniciais (L_0) medidos com um paquímetro. O volume das tiras foi determinado por densitometria simples e calculado como $Vol = \Delta F / \delta$, onde ΔF é a alteração total na força devido à imersão da tira na solução de Krebs-Henseleith, e δ é a densidade de massa da solução Krebs-Henseleith ($1,002 \text{ g/cm}^3$) (ROCCO *et al.*, 2001).

Posteriormente, as tiras de tecido pulmonar foram suspensas verticalmente num banho, contendo solução Krebs-Henseleith a 37°C e continuamente borbulhada com a mistura carbogênica, através de ganchos de metal fixados nas extremidades das tiras com cianocrilato e acoplados a transdutores de força (FT03, *Grass Instruments Co.*, Quincy, MA, EUA) (ROCCO *et al.*, 2001; ROMERO *et al.*, 2001). O movimento da haste conectada ao alto-falante era transmitido para uma mola de prata, com módulo de Young conhecido, conectada a outro transdutor de força, permitindo as medidas de deslocamento da mesma (Figura 6).

Todo o sistema foi conectado a um gerador de função, o computador, que determinou a forma da onda, a frequência e a amplitude de oscilação da tira. Portanto, esses sinais foram condicionados, passando através de filtros Bessel de oito pólos (902LPF, *Frequency Devices*, Haverhill, MA, EUA) e sendo convertidos análogo-digitalmente.

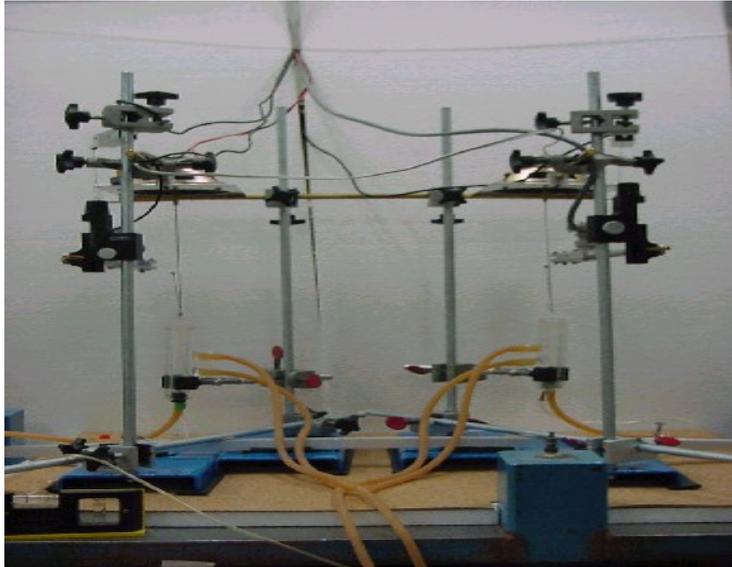


Figura 7. Montagem experimental para medida da mecânica tecidual.

A área de seção transversa inicial da tira de tecido (A_0) foi determinada através da relação entre o volume e o comprimento iniciais da mesma, de acordo com $A_0 = \text{vol}/L_0$ (MORETTO *et al.*, 1994; YUAN *et al.*, 2000). Para um estresse de $1 \times 10^{-2} \text{ N/m}^2$, a força basal (FB) foi calculada como $\text{FB (N)} = A_0 (\text{m}^2) \times 10^{-2} \text{ N/m}^2$ e ajustada pelo deslocamento vertical do transdutor de força (YUAN *et al.*, 2000).

Durante 10 minutos, cada tira de tecido foi preconditionada através de oscilações senoidais com frequência de 0,5 Hz e amplitude ajustada até que se alcançasse o estresse máximo de $2 \times 10^{-2} \text{ N/m}^2$. Após este período, uma nova FB foi calculada, sendo a amplitude ajustada para 5% de L_B e mantendo a oscilação com frequência de 1 Hz, por mais 30 minutos, ou até que uma curva estável fosse atingida.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS MECÂNICOS TECIDUAIS

As tiras de tecido pulmonar foram submetidas à oscilação senoidal na amplitude de 5% de L_B e frequência de 1 Hz. Para calcular a resistência (R), elastância dinâmica (E) e histeresividade (η) teciduais, foram analisadas as curvas de força-deslocamento (FREDBERG *et al.*, 1989; LOPEZ-AGUILAR *et al.*, 1998).

A área de seção transversa instantânea (A_i) foi determinada como: $A_i = Vol/L_i$ (m^2), onde L_i é o comprimento instantâneo. A tensão instantânea (σ_i) foi calculada dividindo força (N) por A_i .

Todos os parâmetros foram medidos ciclo por ciclo. A resistência tecidual foi determinada a partir da área contida sob a curva força-deslocamento:

$$R = (4.H) / [\pi.\omega.(\Delta\varepsilon)^2]$$

onde H é a área de histerese da curva força-deslocamento, ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$, rad/s), e $\Delta\varepsilon$ é o deslocamento normalizado ou a variação de deslocamento ciclo por ciclo dividido por L_B . A elastância dinâmica tecidual foi determinada por:

$$E = (\Delta\sigma_i / \Delta\varepsilon) \cos\theta$$

onde $\Delta\sigma_i$ representa a variação ciclo a ciclo na força, e θ é o ângulo de fase entre força e deslocamento [$\theta = \sin^{-1} (4H / \pi.\Delta\sigma_i.\Delta\varepsilon)$]. A histeresividade, que quantifica a dependência dos processos dissipativos nos processos elásticos (FREDBERG *et al.*, 1989), foi determinada como:

$$\eta = \tan\theta$$

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA (MORFOMETRIA E CELULARIDADE)

A análise morfométrica foi realizada nos pulmões retirados na capacidade residual funcional. Imediatamente após a remoção dos pulmões em bloco, o pulmão direito foi congelado por imersão rápida em nitrogênio líquido (aproximadamente 3 minutos), retirado e mantido em solução de Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) a -70° C por 24 h. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol:

- MC-1: etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-2: etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a -20°C durante 1 h;
- MC-3: etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a -20°C durante 1 h;
- etanol a 100%, a -20°C durante 1 h e, em seguida, a -4°C durante 24 h.

Depois da fixação, o material foi embebido em parafina, obtendo-se cortes histológicos com 3 µm de espessura.

Os cortes pulmonares foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), segundo seus aspectos qualitativos e quantitativos. Para a análise descritiva, toda a superfície da lâmina foi observada com todas as estruturas pulmonares representadas, em aumento de 100x.

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos ("point-counting") (WEIBEL *et al.*, 1990), utilizando-se uma ocular acoplada ao microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 7).

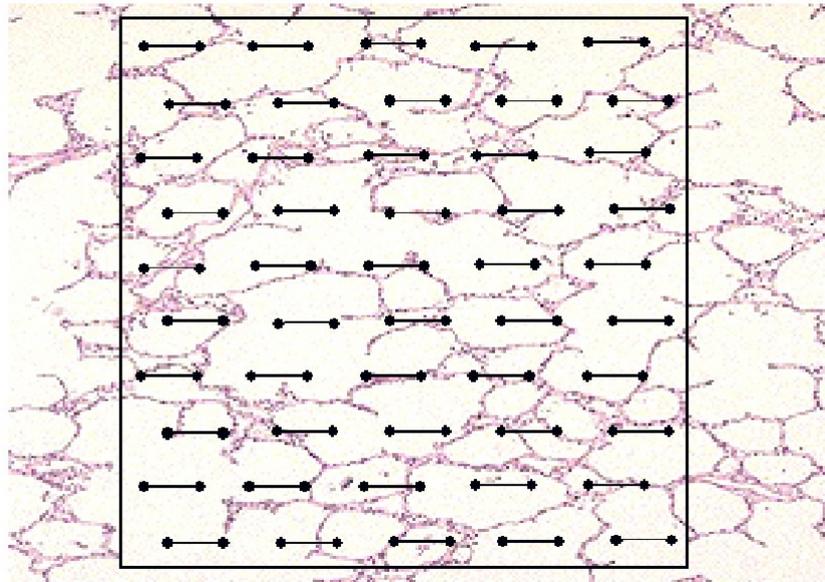


Figura 8 – Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos.

Em um aumento de 200x, foram avaliados dez campos aleatórios e não coincidentes por lâmina, sendo analisadas seis lâminas por grupo, uma por animal. Foi quantificada a fração de área ocupada por alvéolos normais, colapsados e hiperinsuflados (WEIBEL *et al.*, 1990). O número de pontos que caíram em área de alvéolo normal, colapsado ou hiperinsuflado foi dividido pelo total de pontos contados em cada campo analisado (normal + colapsado + hiperinsuflado) e expresso sob a forma de percentual.

Para o cálculo do índice de constrição computou-se o número de interceptos (NI) de linhas que incidissem sobre a membrana basal epitelial e músculo liso e o número de pontos (NP) que caíssem sobre a luz da via aérea, sendo o índice de constrição igual a: $CI = NI/\sqrt{NP}$.

As lâminas também foram coradas com métodos específicos para quantificação de fibras colágenas e elásticas nas vias aéreas e nos septos alveolares. A quantificação das fibras no septo alveolar foi realizada através de um sistema de análise digital e *software* específico (Image-Pro[®] Plus 4.1 para Windows[®]) num aumento de 200x. *Fibras Colágenas*: Os tecidos foram corados em solução de Sirius Red, dissolvido em solução saturada de ácido pícrico e observados sob microscopia de luz polarizada, uma vez que a acentuação da birrefringência do colágeno promovida pelo método de polarização de picrosirius é específica para estruturas colágenas (MONTES *et al.*, 1996). O Sirius Red é um corante ácido que tem sido freqüentemente utilizado para corar fibras colágenas em amostras teciduais. *Fibras elásticas*: Foi utilizado o método de resorcina-fucsina de Weigert modificado por oxidação (ORF) (WEIGERT *et al.*, 1898; ROCCO *et al.*, 2001). A área ocupada por fibras foi determinada por densitometria digital. Para evitar qualquer erro de medida devido a edema septal ou colapso alveolar, as áreas ocupadas por fibras elásticas ou colágenas, medidas em cada septo alveolar, eram divididas pelo comprimento de cada septo estudado. Os resultados foram expressos como quantidade de fibras elásticas e colágenas por unidade de comprimento de septo ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$). Em cada lâmina, foram avaliadas duas a três vias aéreas. A quantificação morfométrica envolveu o cálculo do percentual da área tecidual corada positivamente para fibras elásticas ou colágenas nas regiões de interesse das vias aéreas. As medidas, considerando-se um aumento de 200x da imagem analisada, foram feitas utilizando-se o *software* Image-Pro Plus 4.1 para Windows, num computador IBM-compatível conectado a uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico. Nas grandes vias aéreas, cartilaginosas, as medidas foram feitas na lâmina própria, isto é, entre o limite interno da membrana basal e a borda externa

do músculo liso ou até as placas cartilagosas. Nas vias aéreas menores, não cartilagosas, nas quais as estruturas das paredes alveolares são menos precisas, toda a região submucosa até a camada adventícia foi analisada. Dessa forma, a análise limitou-se à matriz extracelular e aos elementos contráteis das vias aéreas, região mais comprometida pelo remodelamento. Os resultados foram expressos como área de fibras elásticas ou colágenas/perímetro da membrana basal ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$).

As lâminas de tecido pulmonar também foram coradas com a técnica de Luna para identificação de eosinófilos (YING *et al.*, 2002). Através da morfometria convencional, foi acessada a densidade eosinofílica nas paredes das vias aérea e dos vasos. Com um retículo de 100 pontos conectado à lente do microscópio; foi contabilizado o número de pontos que incidiram na área externa da parede da via aérea (localizada entre o limite externo do músculo liso e a adventícia) e o número de pontos que incidiram sob a adventícia dos vasos sangüíneos. A área de tecido em cada campo do microscópio foi calculada de acordo com o número de pontos que incidiram sobre o tecido, em proporção à área total. Logo, foi contabilizado o número de eosinófilos por área de tecido. A densidade eosinofílica foi determinada como o número de eosinófilos em cada campo dividido pela área de tecido. As medidas foram expressas em células/ mm^2 (WEIBEL *et al.*, 1990). A contagem foi realizada em 4 vias aéreas e 4 vasos (12 a 18 campos) em cada animal, em um aumento de 1.000x.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a análise por microscopia eletrônica foram retirados três fragmentos de parênquima pulmonar (2x2x2 mm). Os fragmentos foram colocados em glutaraldeído a

2% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4, por 2 h, sendo posteriormente lavados em solução de sacarose, constituída de 4,5 g de NaCl e 8,9 g de sacarose diluídos em 500 mL de água destilada, até a pós-fixação. A seguir, os fragmentos foram imersos em solução de tetróxido de ósmio (1% em água, contendo 133 mg de sacarose por mL), por 2 h. Após a lavagem em água bidestilada, as preparações foram colocadas na geladeira em acetato de uranila 0,5% contendo 133 mg de sacarose, por um tempo que variou de 2 a 24 h. O processo foi continuado, efetuando-se a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, progredindo gradativamente até álcool absoluto, sendo, então, o tecido passado em óxido de propileno por 15 minutos (2 vezes). Iniciando a fase de inclusão, as amostras foram colocadas em misturas de partes iguais de óxido de propileno e resina (araldite). Os frascos contendo os fragmentos foram colocados para girar (1 rotação a cada 4 minutos, por 1 h). Posteriormente, as peças foram colocadas por 16 h em resina, com a seguinte composição: 10 mL de araldite (Cy-205), 8 mL de endurecedor DDSA (anidrido de ácido doxecenil succínico), 0,5 mL de acelerador (N-benzildimetilamina) e 0,1 mL de plastificante (dibutilftaltato). Ao término de 16 h, as amostras foram colocadas em moldes de silicone com nova resina, para polimerização em estufa a 60°C, por 5 dias. Concluída a polimerização, os espécimes foram aparados e cortes semifinos obtidos com o ultramicrótomo Porter Blum MT2 (Reichert Ultracult S). Tais cortes com 0,5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro e corados com uma mistura de azul de metileno a 1% e azur II, em partes iguais e a quente. Nestes cortes, selecionou-se áreas representativas das lesões. De cada espécime, 2 blocos, contendo aproximadamente 10 fragmentos cada um, foram submetidos à análise para seleção dos cortes ultrafinos.

Para o estudo ultraestrutural, cortes ultrafinos, com espessura em torno de 90

nanômetros, foram contrastados pelo acetato de uranila a 2% durante 30 minutos e, finalmente, pelo citrato de chumbo por 10 minutos. A observação dos cortes e as eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico JEOL (JEOL 1010, Japão).

Análise submicroscópicas do tecido pulmonar demonstraram que a extensão e distribuição das alterações parenquimatosas estavam inhomogêneas ao longo do bronquíolo e do tecido alveolar (ductos alveolares e alvéolos). Logo, as fotomicrografias eletrônicas representativas dos grupos C e SA foram aumentadas para um tamanho adequado a fim de visualizar os seguintes parâmetros: a) áreas colapsadas e normais (KATZENSTEIN *et al.*, 1985; BURKHARDT *et al.*, 1989; MYERS *et al.*, 1989); b) estruturas hiperinsufladas com morfologia distinta de um alvéolo e maiores que 120 μm (KATZENSTEIN *et al.*, 1985; BURKHARDT *et al.*, 1989; MYERS *et al.*, 1989); c) vias aéreas: descamação epitelial, membrana basal, músculo liso (JEFFREY *et al.*, 1992); e d) eosinófilos (JEFFREY *et al.*, 1992).

Realizou-se análise semiquantitativa dos componentes ultraestruturais por dois patologistas que desconheciam o grupo estudado conforme o esquema abaixo:

0: ausência de alterações

+: alterações em 1 a 25% do tecido analisado

++: alterações em 25 a 50% do tecido analisado

+++: alterações em 50 a 75% do tecido analisado

++++: alterações em 75 a 100% do tecido analisado

As pontuações semiquantitativas das lesões ultraestruturais representam a média da intensidade das lesões presentes em todas as seções submicroscópicas examinadas (três ou quatro seções).

4.8 ANÁLISE DO FLUIDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (BALF)

Um outro grupo de vinte animais (10 animais/grupo) foi submetido ao mesmo protocolo do grupo asma alérgica grave (SA), previamente descrito, para obter as alíquotas do fluido do lavado broncoalveolar. Os animais foram sacrificados em uma câmara de CO₂, exangüinados, traqueotomizados, e a coleta do BALF foi realizada, lavando-se os pulmões três vezes com 1,0 ml salina fisiológica estéril (0.9% NaCl a 37° C). A contagem total de leucócitos foi realizada em uma câmara de Neubauer sob microscópio óptico após a diluição das amostras em uma solução de Turk (2% ácido acético). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em lâminas de cytopspin, coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa. Os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 foram analisados em uma câmara livre de toxinas através do método ELISA de acordo com as instruções do fabricante (*Duo Set, R&D Systems*, Mineápolis, EUA).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa estatístico SigmaStat 2.0 (*Jandel Corporation*, San Raphael, CA, EUA) foi utilizado para as comparações estatísticas. As diferenças entre os três grupos foram analisadas utilizando-se one-way ANOVA seguido do teste Tukey para múltiplas comparações. A comparação entre os grupos C e SA foi realizada utilizando-se teste *t*-Student. A correlação entre os dados mecânicos e histológicos foi determinada pela correlação de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Parâmetros morfométricos

A fração de área de colapso alveolar e o índice de constrição aumentaram progressivamente do grupo C para os grupos SA e MA (Tabela 1). A celularidade tecidual foi maior nos grupos SA e MA em comparação com o grupo C (Tabela 1, Figura 8). As lâminas fixadas pela técnica de Luna demonstraram aumento no número de eosinófilos no grupo SA ($C = 218 \pm 26$ células/mm² e $SA = 650 \pm 42$ células/mm²) (Figura 8).

Tabela 1. Parâmetros Morfométricos

Grupos	Alvéolos	Colapso	Índice de	Celularidade	PMN (%)
	Normais (%)	Alveolar (%)	Constricção	Total (%)	
C	93,1 ± 0,9	6,8 ± 0,9	1,48 ± 0,06	27,89 ± 0,71	8,11 ± 0,81
SA	68,4 ± 2,3*	31,0 ± 2,0*	1,70 ± 0,03*	30,90 ± 0,67*	24,91 ± 0,74*
MA	37,3 ± 2,1*†	62,6 ± 2,1*†	1,89 ± 0,03*†	31,38 ± 2,71*	27,98 ± 0,92*

Valores são médias (\pm SEM) de 6 animais em cada grupo. No grupo de asma alérgica grave (SA), os camundongos foram sensibilizados com ovalbumina e expostos a desafios repetidos com instilações intratraqueais de ovalbumina. No grupo MA, os camundongos do grupo SA receberam metacolina por via venosa imediatamente antes da medida da mecânica pulmonar. O grupo controle (C) recebeu salina sob o mesmo protocolo. PMN: células polimorfonucleares. Os dados foram coletados de dez campos não coincidentes por animal. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$). † Significativamente diferente do grupo SA ($p < 0,05$).

Figura 9. Fotomicrografias representativas das vias aéreas e parênquima pulmonar

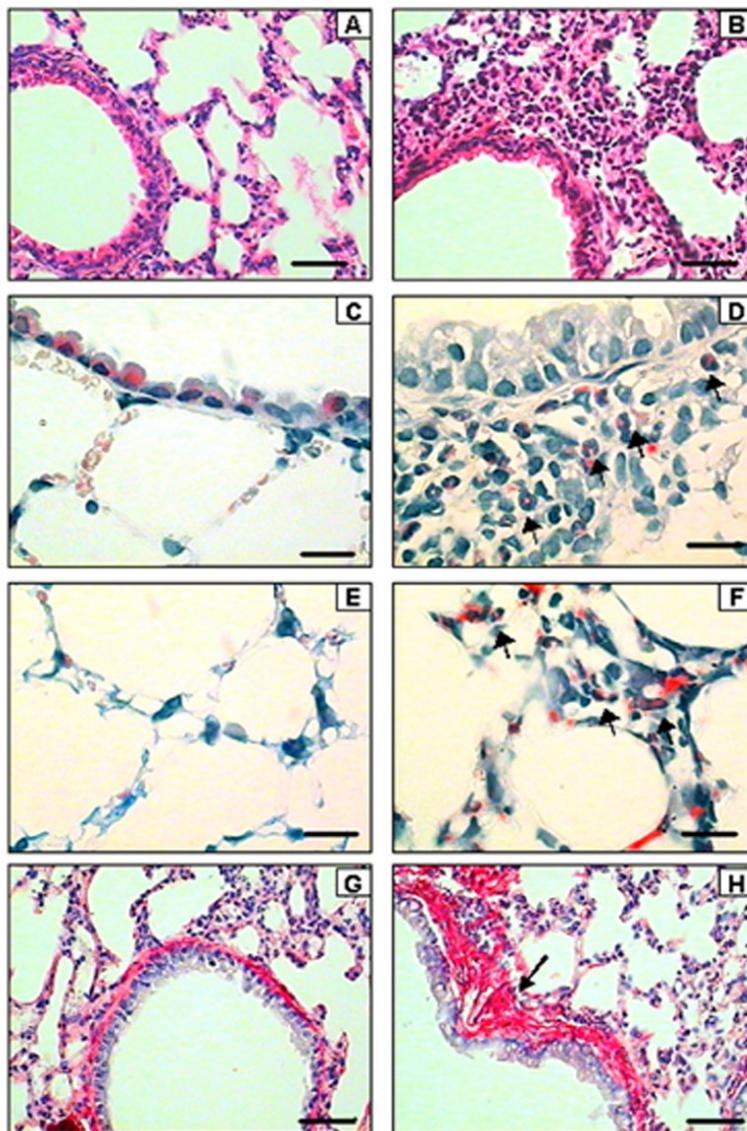


Figura 8. Fotomicrografias representativas das vias aéreas e parênquima pulmonar dos grupos controle (fotos à esquerda) e asma alérgica grave (fotos à direita). Nos painéis A e B, os pulmões foram fixados com hematoxilina-eosina. Nos painéis C-F, utilizou-se a fixação por técnica de Luna. Nos painéis D e F, foi observada inflamação eosinofílica (setas) na via aérea (D) e parênquima (F). Nos painéis G e H, utilizou-se o método Picrosirius sob luz polarizada. Em detalhe (seta) o aumento de deposição de colágeno no grupo SA. No grupo SA, os animais foram sensibilizados e expostos à desafios subseqüentes com instilação intratraqueal de ovalbumina. O grupo controle (C) recebeu salina sob o mesmo protocolo. Escala da barra nas fotos em A, B, G e H = 25 μ m. Escala da barra nas fotos em C, D, E e F = 10 μ m.

5.2 Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF)

O número total de células no BALF foi significativamente maior no grupo SA do que no grupo C, com predomínio de eosinófilos e neutrófilos. O grupo SA mostrou elevações significativas nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no BALF comparado com o grupo C (Tabela 2).

Tabela 2. Contagem de células e citocinas no fluido do lavado broncoalveolar.

	C	SA
Células totais (10^6 /ml)	$1,88 \pm 0,16$	$10,57 \pm 0,50^*$
Eosinófilos (10^6 /ml)	$0,6 \pm 0,7$	$6,80 \pm 0,37^*$
Neutrófilos (10^6 /ml)	$0,38 \pm 0,17$	$1,03 \pm 0,30^*$
Monócitos (10^6 /ml)	$0,90 \pm 0,03$	$2,73 \pm 0,31^*$
IL-4 (pg/ml)	$38,67 \pm 8,72$	$89,89 \pm 11,87^*$
IL-5 (pg/ml)	$92,73 \pm 7,10$	$160,21 \pm 15,83^*$
IL-13 (pg/ml)	$882,97 \pm 40,95$	$2378,88 \pm 55,72^*$

Valores são médias (\pm SEM) de 10 animais em cada grupo. No grupo SA, os camundongos foram sensibilizados com ovalbumina e expostos a desafios repetidos de instilações intratraqueais de ovalbumina. O grupo controle (C) recebeu salina sob o mesmo protocolo. *Significativamente diferente do grupo C ($p < 0,05$).

5.3 Fibras colágenas e elásticas

Os conteúdos de fibras colágenas no septo alveolar ($C=0.04\pm 0.01\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $SA=0.22\pm 0.01\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) e na via aérea ($C=6.30\pm 0.98\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $SA=13.74\pm 4.21\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) foram maiores no grupo SA do que no grupo C (Figura 6). Não houve diferença significativa na quantidade de fibras elásticas no septo alveolar ($C=0.36\pm 0.05\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $SA=0.37\pm 0.02\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) e nas vias aéreas ($C=1.07\pm 0.29\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $SA=1.10\pm 0.23\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) entre os grupos.

Tabela 3. Modificações ultraestruturais e histológicas no modelo murino de asma alérgica grave

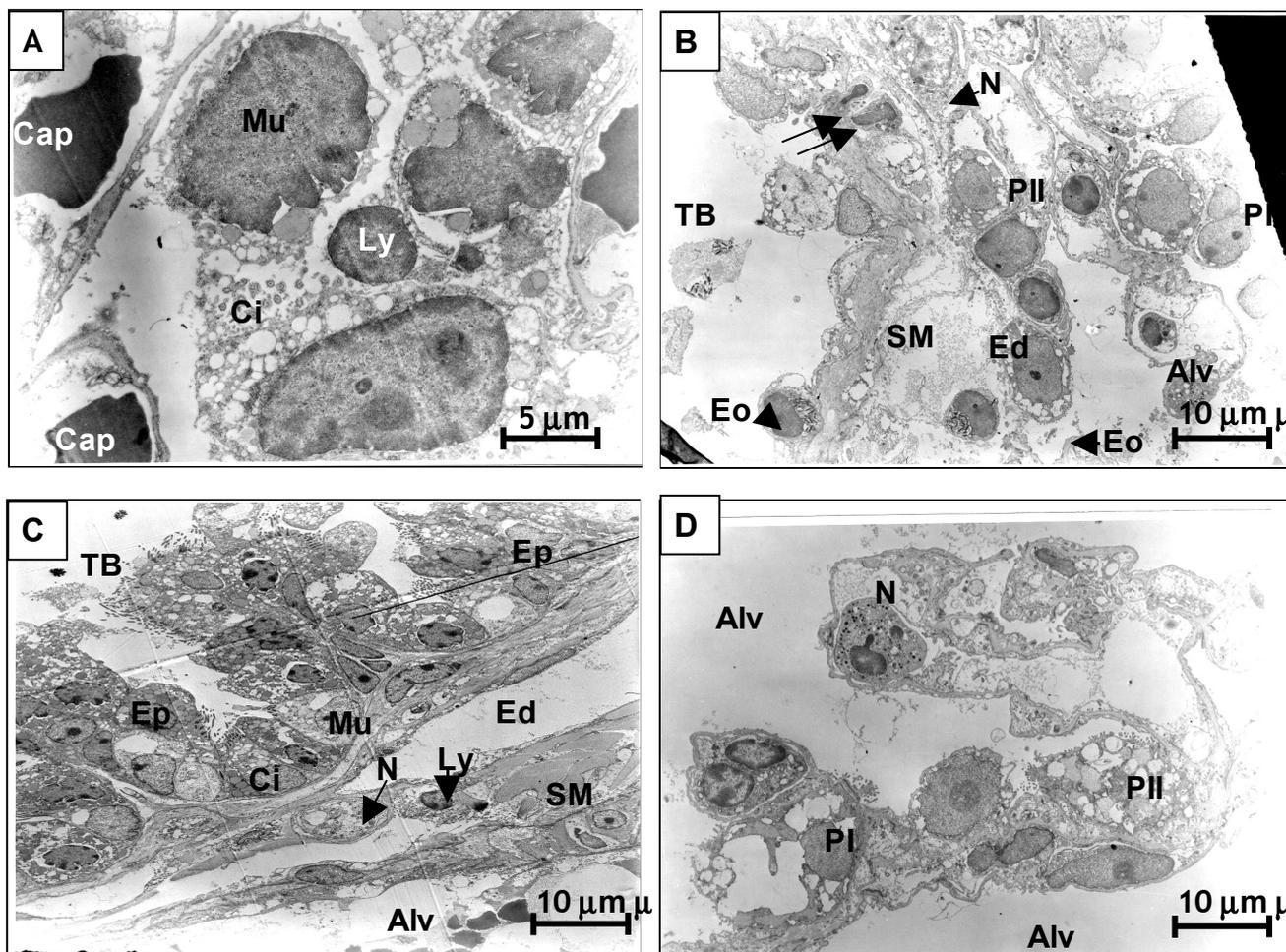
Características	Modelo Murino de Asma Alérgica	
	Grave	
Espessamento e lesão do epitélio de via aérea		+++
Edema de vias aéreas		+++
Neutrófilos Intra-epiteliais		++
Linfócitos Intra-epiteliais		++
Infiltração Eosinofílica		++++
Congestão dos Vasos Brônquicos		+++
Deposição de Colágeno		++++
Hipertrofia de Músculo Liso		+++
Hiperplasia de Glândulas Mucosas		+++

Análise semiquantitativa da histologia pulmonar utilizando-se escore de gravidade de 5 pontos: 0: ausência de alterações, +: alterações em 1 a 25% do tecido analisado, ++: alterações em 25 a 50% do tecido analisado, +++: alterações em 50 a 75% do tecido analisado, ++++: alterações em 75 a 100% do tecido analisado.

5.4 Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica do grupo SA demonstrou edema de células mucosas proeminente e desacoplamento entre o epitélio e a membrana basal (Figura 9C). Observou-se lesão da superfície epitelial (Figura 9B). Devido à lesão epitelial de via aérea, notou-se que o músculo liso está diretamente em contato com a luz bronquiolar (Figura 9B). A superfície da membrana se encontrava descamada (Figura 9B). As células mucosas estavam desarranjadas e as células ciliadas se encontram lesadas (Figura 9C). No painel 9C, constatou-se presença de células inflamatórias na via aérea tais como linfócitos e eosinófilos. Em alguns animais, os neutrófilos apareceram em contato com as fibras de músculo liso (Figuras 9A e 9B, Tabela 3). O espaço alveolar demonstrou pneumócitos tipo I e tipo II preservados sobrepostos à membrana basal adjacente (Figura 9D).

Figura 10. Microscopia eletrônica do bronquíolo terminal e espaço alveolar



Fotomicroscopia eletrônica do bronquíolo terminal e espaço alveolar. No painel A, observou-se células mucosas (Mu) e células ciliadas (Ci). Ly: linfócitos, Cap: capilar. No painel B, a membrana basal epitelial (Ep) (setas) estava lesada. Neutrófilos (N) estavam em contato com as fibras de músculo liso (SM). Além disso, a membrana basal epitelial encontrava-se descamada. Eo: eosinófilos, Alv: alvéolo, TB: bronquíolo terminal, PII: pneumócitos tipo II. A membrana basal epitelial estava evidente com detalhes de edema (setas) (painel C). Ed: edema. No painel D observou-se pneumócitos tipo I (PI) e pneumócitos tipo II (PII) normais. As fotomicrografias são representativas de modificações patológicas observadas em 6 animais do grupo SA.

5.5 Mecânica respiratória *in vivo* e *in vitro*

Não houve diferença estatística em relação ao fluxo e volume entre os diferentes grupos. ΔP_1 , ΔP_2 , ΔP_{tot} , Est e E foram significativamente maiores nos grupos SA e MA do que no grupo C. ΔP_1 , ΔP_2 , ΔP_{tot} , Est, E e R foram significativamente maiores no grupo MA do que no grupo SA. A histeresividade foi similar em todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros da mecânica *in vivo* e *in vitro*

	C	SA	MA
<i>In vivo</i>			
Fluxo (ml/s)	1,07 ± 0,02	1,04 ± 0,01	1,09 ± 0,01
Volume (ml)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Est (cmH ₂ O/ml)	18,27 ± 1,34	50,22 ± 6,83*	65,34 ± 4,98*
ΔP _{tot} (cmH ₂ O)	0,94 ± 0,02	1,70 ± 0,08*	2,40 ± 0,17*†
ΔP ₁ (cmH ₂ O)	0,32 ± 0,02	0,43 ± 0,01*	0,58 ± 0,04*†
ΔP ₂ (cmH ₂ O)	0,62 ± 0,02	1,26 ± 0,07*	1,82 ± 1,17*†
<i>In vitro</i>			
E (10 ⁴ N/m ²)	1,11 ± 0,04	1,61 ± 0,06*	2,08 ± 0,18*†
R (10 ² N.s/m ²)	0,99 ± 0,03	1,07 ± 0,10	1,60 ± 0,09*†
η	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01

Valores são médias (±SEM) de 6 animais (10 determinações/animal) em cada grupo. No grupo de asma alérgica grave (SA), os camundongos foram sensibilizados com ovalbumina e expostos a desafios repetidos com instilações intratraqueais de ovalbumina. No grupo MA, os camundongos foram submetidos ao mesmo protocolo do grupo SA mas metacolina foi injetada via venosa imediatamente antes do experimento. O grupo controle (C) recebeu salina sob o mesmo protocolo. Est, ΔP_{tot}, ΔP₁, e ΔP₂ = elastância estática pulmonar, pressões total, resistiva e viscoelástica/inomogênea, respectivamente. E, R, η = elastância dinâmica, resistência tecidual e histeresividade, respectivamente. *Significativamente diferente do grupo C. †Significativamente diferente do grupo SA (p < 0,05).

5.6 Hiperresponsividade Brônquica

No grupo SA, a metacolina aumentou a resistência total independente da dose (Figura 10). A dose de metacolina utilizada para induzir um efeito broncoconstritor nos animais do grupo SA corresponde à penúltima dose (3000 μ g/kg) utilizada para a construção da curva de dose-resposta.

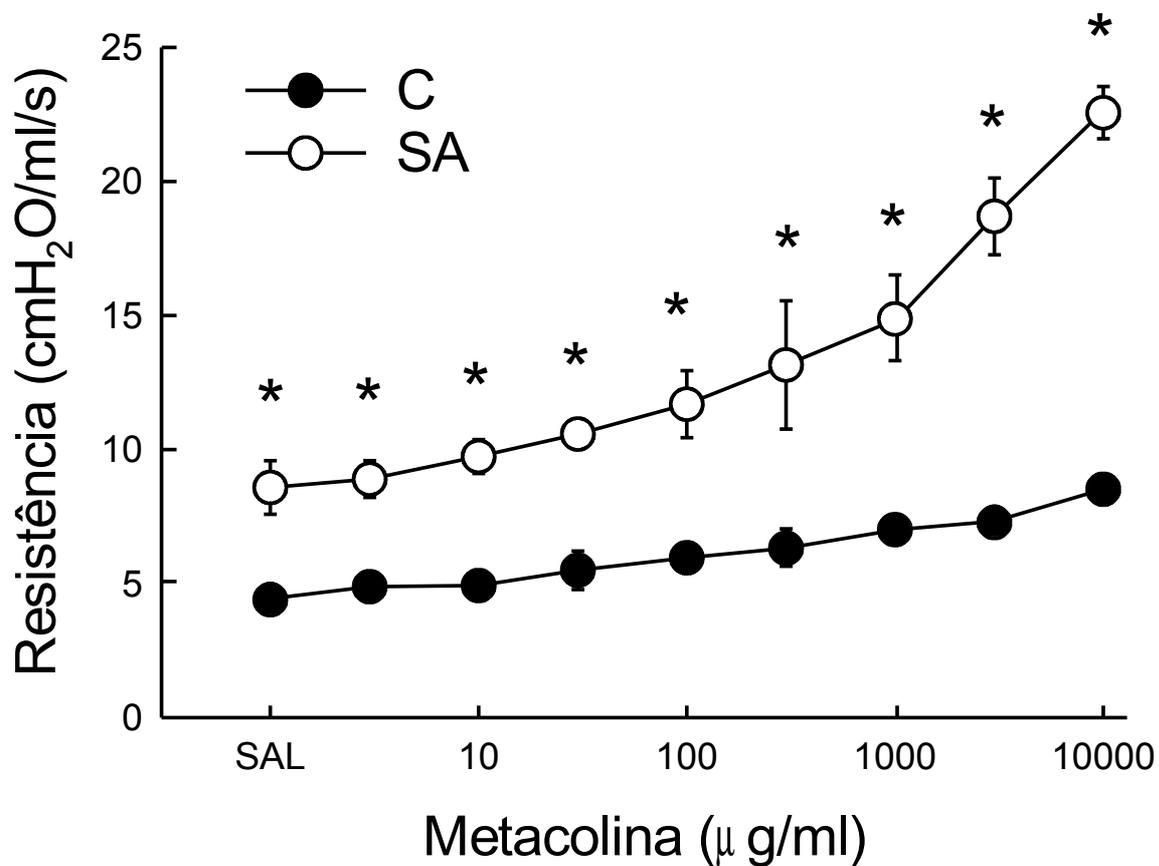


Figura 11. Hiperresponsividade de via aérea em camundongos BALB/c após a exposição crônica de salina ou OVA. A resistência de via aérea foi mensurada em resposta a doses crescentes de metacolina. C = grupo controle, SA = grupo de asma alérgica grave. Dados estão representados como médias \pm SEM (n=4/cada).

5.7 Correlação entre os parâmetros funcionais e morfométricos

Considerando os grupos C e SA juntos, a elastância estática e a pressão viscoelástica/inomogênea tiveram uma correlação significativa com a fração de colapso alveolar e o total de células no septo alveolar. $\Delta P1$ se correlacionou com o índice de constrição (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de correlação entre os parâmetros fisiológicos e morfométricos

	Índice de Constricção	Colapso Alveolar (%)	Celularidade Total (%)
Est,L (cmH ₂ O.mL ⁻¹)	0.55 (0.06)	0.84 (<0.001)	0.70 (0.01)
ΔP2,L (cmH ₂ O)	0.70 (0.01)	0.96 (<0.001)	0.87 (<0.001)
ΔP1,L (cmH ₂ O)	0.73 (0.006)	0.78 (0.002)	0.75 (0.004)
Fibras de Colágeno (μm ² / μm)			
E (10 ⁴ . N.m ⁻²)		0.71 (0.008)	

Est, ΔP2, ΔP1: elastância estática pulmonar, pressões viscoelásticas/inomogênea e resistiva, respectivamente; os valores de *p* estão entre parênteses. A correlação foi realizada com os dados dos grupos controle e de asma alérgica grave.

DISCUSSÃO

6. Discussão

O presente estudo desenvolveu um modelo de asma alérgica grave com importantes modificações histológicas, na mecânica pulmonar e tecidual, e no processo inflamatório. Esse protocolo induziu altos níveis de citocinas relacionadas à resposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), infiltrado eosinofílico na via aérea e no parênquima pulmonar e hiperreatividade brônquica. Além disso, constataram-se alterações patológicas compatíveis àquelas encontradas na asma grave humana, tais como espessamento e lesão do epitélio da via aérea, fibrose subepitelial, hipertrofia de músculo liso e colapso alveolar, que prejudicou significativamente a mecânica pulmonar *in vivo* e *in vitro*.

Determinados modelos murinos de asma alérgica têm demonstrado ser extremamente úteis na avaliação dos mecanismos de inflamação alérgica e a conseqüente resposta imunológica (FULKERSON *et al.*, 2005). Adicionalmente, esses modelos murinos não são influenciados por fatores que dificultam o estudo da fisiopatologia da asma grave humana tais como: variabilidade no fenótipo clínico, influências ambientais não-controladas e heterogeneidade genética da população estudada (EWART *et al.*, 2003). Complementarmente, o estudo da patogênese da asma em humanos apresenta uma série de dificuldades tais como: obtenção de amostras do parênquima pulmonar para análise histológica e imunohistoquímica, realização de múltiplas análises histológicas no mesmo paciente, problemas associados a estudos simultâneos celulares/moleculares e de função pulmonar em um só indivíduo e limitações quanto ao tamanho da amostra populacional. Entretanto em relação aos modelos murinos, há vários resultados controversos principalmente relacionados à variabilidade genética do camundongo, aos protocolos utilizados para a

indução da asma alérgica e aos diferentes métodos utilizados para avaliar as respostas imunológicas e inflamatórias (BREWER *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2002). No presente estudo, camundongos BALB/c foram utilizados porque eles apresentam elevada hiperresponsividade de via aérea e eosinofilia após a sensibilização e desafio com alérgeno (WHITEHEAD *et al.*, 2003). Para desenvolver esse modelo de asma alérgica grave realizou-se um estudo piloto em que foram testadas diversas doses de ovalbumina para sensibilização dos animais, como também diversos protocolos, sendo a meta final a presença de alterações histológicas e funcionais que se assemelhassem à asma grave humana.

A fisiopatologia da asma grave continua pouco compreendida especialmente devido a limitação na obtenção de tecidos pulmonares. A inflamação persistente da via aérea e as modificações estruturais irreversíveis da árvore brônquica, definidas como remodelamento de via aérea (BOUSQUET *et al.*, 1996), acarretam grande impacto na função pulmonar de pacientes com asma grave. No presente estudo constatou-se aumento na fração de área de colapso alveolar e o índice de constrição nos grupos SA e MA, sugerindo que o processo inflamatório também acomete as vias aéreas periféricas, conforme previamente descrito em humanos (CARROLL *et al.*, 1997; BALZAR *et al.*, 2005; DE MAGALHÃES SIMOES *et al.*, 2005) (Tabela 1, Figura 9). A asma grave é dividida em pelo menos dois diferentes subtipos patológicos com base na presença ou ausência de eosinófilos (WENZEL *et al.*, 1999). A infiltração eosinofílica pulmonar tem sido considerada uma característica histológica marcante na asma. Entretanto, o real papel do eosinófilo na patogênese da asma persiste controverso já que: (a) a inflamação eosinofílica está presente na luz da via aérea de somente 50% dos indivíduos com asma (DOUWES *et al.*, 2002), (b) mesmo em determinadas inflamações eosinofílicas, como, por exemplo, na bronquite eosinofílica,

não há indução de asma (BRIGHTLING *et al.*, 2003), (c) a exacerbação da asma ocorre na ausência de eosinófilos na via aérea (WILDER *et al.*, 1999), (d) as estratégias anti-eosinofílicas específicas, por exemplo, tratamento com anti-IL-5 e IL-12, não são eficientes em inibir as respostas funcionais em experimentos *in vivo* (LECKIE *et al.*, 2000) e (e) camundongos deficientes em eosinófilos têm sido recentemente desenvolvidos e continuam a apresentar resposta inflamatória em modelos de sensibilização e desafio com ovalbumina (HUMBLES *et al.*, 2004). Entretanto, a inflamação eosinofílica não é um achado universal e diferentes fenótipos podem existir, com o neutrófilo, ao invés do eosinófilo, presente em algumas formas de asma grave humana (JATAKANON *et al.*, 1999). A presença ou ausência de eosinófilos tem sido analisada na fase precoce ou tardia da asma grave (WENZEL, 2005). Nesse contexto, a eosinofilia persistente parece ser mais prevalente no fase tardia da doença. De Magalhães Simões e colaboradores analisaram o padrão celular inflamatório do trato respiratório de pacientes que morreram de asma e demonstraram o predomínio de eosinófilos tanto nas vias aéreas centrais como nas periféricas (DE MAGALHÃES SIMÕES *et al.*, 2005). Esses resultados devem ser interpretados com cuidado, já que dependem do momento exato da exacerbação, do número de exposições, do tipo de alérgeno, da variabilidade genética, a idade de início, baixa aderência ao tratamento e presença de sinusite. No presente estudo foi observado que o número de eosinófilos e neutrófilos estavam aumentados tanto no parênquima pulmonar como no BALF no grupo SA comparado ao do grupo controle (Tabelas 1 e 2, Figuras 8 e 9). A microscopia eletrônica demonstrou infiltrado eosinofílico nas regiões perivasculares e peribronquiolares. Entretanto, em alguns animais, algumas células neutrofilicas estavam em contato direto com as fibras de músculo liso (Figura 9). Blic e colaboradores também observaram um aumento significativo de eosinófilos e

neutrófilos no epitélio de crianças com asma grave (DE BLIC *et al.*, 2004). Embora os neutrófilos estejam envolvidos na imunidade inata, isto é, como o primeiro grupo de células a chegar ao local lesado, eles podem participar na resposta inflamatória Th2 como, por exemplo, na asma grave persistente (JATAKANON *et al.*, 1999; KOBAYASHI *et al.*, 2005).

O padrão celular T-helper 2 (Th2) de citocinas [(IL)-4, IL-5 e IL-13] possui um importante papel na patogênese da asma alérgica em modelos murinos e em humanos (MOJTABAVI *et al.*, 2002). Embora os eosinófilos tenham sido associados com o processo imune Th2, ainda não está claro se a inflamação Th2 leva a uma eosinofilia pulmonar na asma grave. No presente estudo, os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 se elevaram significativamente no grupo SA. Além disso, IL-4, IL-5 e IL-13 atuam na hiperreatividade brônquica, infiltração eosinofílica e no remodelamento pulmonar (HOGAN *et al.*, 1998; KIPS *et al.*, 2003; WILLS-KARP *et al.*, 2004). Nesse contexto, os pacientes com asma grave tratados com anticorpo anti-interleucina-5 não demonstraram melhora clínica, apesar da alta redução no número de eosinófilos no sangue (>90% em comparação com o placebo) (KIPS *et al.*, 2003).

O método utilizado para a determinação da mecânica pulmonar permite a identificação dos componentes elásticos, resistivos e viscoelásticos e/ou inhomôgeneos (BATES *et al.*, 1985). A pressão resistiva aumentou no presente modelo de asma alérgica grave (Tabela 4), provavelmente devido à broncoconstrição (Tabelas 1 e 5), edema brônquico (Figura 9) e remodelamento da via aérea (Figura 8).

O remodelamento da via aérea levou a uma redução da distensibilidade da via aérea, estreitamento da luz com o encurtamento do músculo liso e obstrução irreversível do fluxo aéreo, aumentando, portanto, a resistência da via aérea. A

microscopia eletrônica demonstrou lesão epitelial da via aérea com fibrose subepitelial (Figura 9). Esses achados corroboram os estudos prévios, que descreveram que a inflamação persistente da via aérea e as modificações estruturais irreversíveis da parede brônquica, definida como remodelamento de via aérea, são importantes características da asma grave (JEFFERY *et al.*, 1992; BENAYOUN *et al.*, 2003). A hipertrofia do músculo liso (Figura 9 e Tabela 3) é de extrema importância para a fisiopatologia da asma grave em função de sua contribuição para a hiperresponsividade da via aérea (LAMBERT *et al.*, 1993) e da permanente redução do calibre da via aérea (BOUSQUET *et al.*, 1996; BENAYOUN *et al.*, 2003; QUTAYBA, 2003). A hiperresponsividade foi mensurada pela curva de dose-resposta de metacolina e houve um aumento significativo na resistência no grupo SA comparado com o grupo C (Figura 10). Vale ressaltar que o valor basal da resistência no grupo SA foi maior do que no grupo C, provavelmente pelo processo de remodelamento inerente desses animais (ARANTES-COSTA *et al.*, 2002) (Figuras 8B e 8H). Embora as medidas de distensibilidade da via aérea se correlacionem com a fibrose subepitelial (WARD *et al.*, 2001), a hiperresponsividade de via aérea varia na asma grave (BOULET *et al.*, 1997; BENAYOUN *et al.*, 2003). Nesse contexto, constatamos que a resposta das vias aéreas à metacolina foi menor do que aquela usualmente observada em modelos animais de asma alérgica aguda. Tal fato provavelmente ocorre porque: 1) a rigidez da via aérea impede a resposta constritora do agonista (ADLER *et al.*, 1998), 2) os camundongos são menos sensíveis aos agonistas constritores, comparados a outras espécies (PRETOLANI *et al.*, 1994; MCMILIAN *et al.*, 2004), 3) a ausência de modificações na quantidade de fibras elásticas na via aérea e parênquima pulmonar, como também a fragmentação de elastina (MAUAD *et al.*, 1999), facilitando a constrição da via aérea por limitação

do fluxo aéreo, e 4) as respostas são diferentes dependendo da forma de administração do agente constritor (aerosol *versus* intravenoso) (NAGASE *et al.*, 1994). Além disso, tem-se sugerido que a fibrose subepitelial modifica a conexão epitélio-mesênquima, contribuindo para minimizar a resposta constritora (HOLGATE *et al.*, 2004). Alguns autores observaram que o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e as alterações de reatividade não explicam adequadamente a gravidade da doença e acredita-se que outros fatores, tais como modificações no recolhimento elástico e/ou a constrição das pequenas vias aéreas, contribuam para agravar os sintomas da doença (IN'T VEEN *et al.*, 1999). Nesse contexto, constatamos que as elastâncias estáticas e as pressões viscoelásticas e/ou inomogêneas foram maiores no grupo SA e MA quando comparados com as do grupo C (Tabela 4). Há controvérsias sobre o comportamento do recolhimento elástico em pacientes com asma grave. Alguns pacientes apresentam perda do recolhimento elástico, não relacionado à presença de áreas de enfisema pulmonar, mas provavelmente por perda de acoplamentos parênquima-via aérea (MAUAD *et al.*, 2004). Por outro lado, uma redução da complacência foi também descrita (LIU *et al.*, 1995). O aumento da elastância pulmonar e a pressão viscoelástica e/ou inomogênea sugerem a presença de heterogeneidade que pode ser devida a diferentes fatores: colapso alveolar, distorção dos alvéolos patentes e infiltrado tecidual de eosinófilos (Tabela 5, Figuras 8 e 9). Além disso, estudos provenientes de autópsia (DE MAGALHÃES SIMÕES *et al.*, 2005) e feitos em pacientes vivos com asma grave (BALZAR *et al.*, 2002) demonstraram um aumento da inflamação distal no pulmão. Entretanto, essas modificações morfofuncionais da periferia pulmonar também podem ser atribuídas às disfunções do surfactante pulmonar (LIU *et al.*, 1996). Nesse contexto, a terapia com surfactante acarretou efeito benéfico

sobre a função pulmonar em modelos animais com asma aguda (LIU *et al.*, 1996) e em humanos durante as exacerbações da asma (KURASHIMA *et al.*, 1997).

Para melhor entendimento do papel do parênquima pulmonar no atual estudo de asma alérgica grave, a mecânica tecidual foi analisada. As tiras de parênquima pulmonar foram utilizadas como um modelo para estudar as propriedades mecânicas do tecido pulmonar. Fisicamente, o parênquima pulmonar pode ser simplificado como uma matriz conjuntiva viscoelástica conectada a um sistema contrátil que modula suas propriedades mecânicas. Atualmente, aceita-se que a rede de fibra tecidual conjuntiva domina a mecânica do parênquima, junto com a participação menos significativa das células intersticiais (YUAN *et al.*, 1997; LOPEZ-AGUILAR *et al.*, 1998; XISTO *et al.*, 2005). A elastância tecidual foi significativamente maior nos grupos SA e MA em comparação com a do grupo C, enquanto a resistência aumentou somente no grupo MA. Essas modificações no grupo MA poderiam ser atribuídas aos efeitos da metacolina nos receptores M3 localizados na musculatura lisa de via aérea (PETAK *et al.*, 1997). A histeresividade foi similar em todos os grupos. Similarmente, Xisto e colaboradores observaram um aumento da elastância tecidual e resistência, sem modificação na histeresividade, em modelo murino de asma alérgica crônica (XISTO *et al.*, 2005). As modificações na mecânica tecidual foram acompanhadas por deposição de fibras de colágeno sem modificação no conteúdo de fibra elástica. Esses dados sugerem que as fibras constituintes da matriz extracelular contribuíram para as modificações na rigidez e viscosidade pulmonar entre os grupos SA e C. Sabe-se, entretanto, que não somente o aumento absoluto de fibras tem um papel importante no comportamento mecânico do parênquima pulmonar, como também a organização e/ou interação dessas fibras. A ausência dessas modificações na histeresividade tecidual poderia

ser atribuída à não-desorganização da matriz extracelular do parênquima pulmonar (ROCCO *et al.*, 2001). Logo, a disfunção do parênquima pulmonar também apresenta importante papel na fisiopatologia do presente modelo de asma alérgica grave (Tabela 4).

O remodelamento da via aérea apresenta várias modificações estruturais tais como: desacoplamento epitelial, fibrose subepitelial e hiperplasia e hipertrofia de músculo liso. O conteúdo de fibra colágena aumentou significativamente no grupo SA tanto nas vias aéreas como no parênquima pulmonar, provavelmente devido a uma ativação de fibroblastos pulmonares por IL-4, IL-5 e IL-13. Vários autores relataram a participação dessas citocinas na resposta fibrogênica em pacientes com asma grave (ZHU *et al.*, 1999; INGRAM *et al.*, 2003). Xisto e colaboradores demonstraram, em um modelo murino de asma alérgica crônica, que o processo de remodelamento não envolve somente a parede da via aérea, mas também o parênquima pulmonar (XISTO *et al.*, 2005).

CONCLUSÃO

7. Conclusão

O atual modelo de asma alérgica grave nos possibilitou acessar diretamente o papel da via aérea e do parênquima pulmonar na mecânica respiratória, oferecendo uma oportunidade para melhor entender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo. A mecânica pulmonar *in vivo* e *in vitro* demonstraram alterações proporcionadas pelas modificações histopatológicas das vias aéreas e parênquima pulmonar. Estas alterações foram acompanhadas por altos níveis de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), infiltrado eosinofílico na via aérea e parênquima pulmonar e hiperreatividade brônquica. Além disso, constataram-se alterações patológicas compatíveis àquelas encontradas na asma grave humana, tais como espessamento e lesão do epitélio da via aérea, fibrose subepitelial, hipertrofia de músculo liso e colapso alveolar.

REFERÊNCIAS

8. Referências:

1. Adler, A.; Cowley, E.A.; Bates, J.H.T. Airway-parenchymal interdependence after airway contraction in rat explants. **J. Appl. Physiol.** 1998; 85:231-237.
2. Aikawa, T.; Shimura, S.; Sasaki, H.; Ebina, M.; Takishima, T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. **Chest** 1992; 101:916-921.
3. Arantes-Costa, F.M.; Zoriki, S.; Santos, M.H.; Kobata, C.H.; Vieira, J.E.; Martins, M.A. Effects of ventilation, humidity and temperature on airway responsiveness to methacholine in rats. **Eur. Respir. J.** 2002; 19: 1008-1014.
4. Balzar, S.; Chu, H.W.; Strand, M.; Wenzel S.E. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. **Am J Respir Crit Care Med** 2005; 171:431-9.
5. Balzar, S.; Wenzel, S.E.; Chu, H.W. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. **Eur. Respir. J.** 2002; 20:254-259.
6. Barnes, P.J. ; Woolcock, A.J. Difficult asthma. **Eur. Respir. J.** 1998; 12:1209–1218.
7. Bates, J.H.; Baconnier, P.; Milic-Emili, J. A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J. Appl. Physiol.** 1988; 64: 2204-2214.
8. Bates, J.H.; Rossi, A.; Milic-Emili, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. **J. Appl. Physiol.** 1985; 58: 1840–1848.
9. Bates, J.H.; Shardonofsky, F.; Stewart, D.E. The low-frequency dependence of respiratory system resistance and elastance in normal dogs. **Respiration Physiology** 1989; 78: 369-382.

10. Beasley, R. The burden of asthma with specific reference to the United States. **J. Allergy Clin. Immunol.** 2002; 109:S482-S489.
11. Beavitt, S.J.E.; Harder, K.W.; Kemp, J.M.; Jones, J.; Quilici, C.; Casagrande, F.; Lam, E.; Turner, D.; Brennan, S.; Sly, P.D.; Tarlinton, D.M.; Anderson, G.P.; Hibbs, M.L. Lyn-Deficient Mice Develop Severe, Persistent Asthma: Lyn Is a Critical Negative Regulator of Th2 Immunity. **J. Immunol.** 2005; 175:1867-1875.
12. Benayoun, L.; Druilhe, A.; Dombert, M.C.; Aubier, M.; Pretolani, M. Airway Structural Alterations Selectively Associated with Severe Asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2003; 167:1360-1368.
13. Boulet, L.; Laviolette, M.; Turcotte, H.; Cartier, A.; Dugas, M.; Malo, J.; Boutet, M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. **Chest** 1997; 112: 45–52.
14. Bousquet, J.; Lacoste, J.Y.; Chanez, P.; Vic, P.; Godard, P.; Michel, F.B. Bronchial elastic fibers in normal subjects and asthmatic patients. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1996; 153:1648-1654.
15. Bradley, B.L.; Azzawi, M.; Jacobson, M.; Assoufi, B.; Collins, J.V.; Irani, A.M.; Schwartz, L.B.; Durham, S.R.; Jeffery, P.K.; Kay, A.B. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. **J. Allergy Clin. Immunol.** 1991; 88:661-674.
16. Brewer, J.P.; Kisselgof, A.B.; Martin, T.R. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1999; 160:1150-1156.
17. Brightling, C.E.; Symon, F.A.; Birring, S.S.; Bradding, P.; Wardlaw, A.J.; Pavord,

- I.D. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. **Thorax** 2003; 58:528-532.
18. Burkhardt, A. Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. **Am. Ver. Respir. Dis.** 1989; 140: 513-524.
19. Carroll, N.; Cooke, C.; James, A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. **Eur. Respir. J.** 1997; 10:292-300.
20. Chang, H.K.; Mortola, J.P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. **J. Appl. Physiol.** 1981; 51:218-225.
21. D'Angelo, E.; Calderini, E.; Torri, G.; Robatto, F.M.; Bono, D.; Milic-Emili, J. Respiratory mechanics in anesthetized paralyzed humans: effects of flow, volume, and time. **J. Appl. Physiol.** 1989; 67: 2556-2564.
22. De Blic, J.; Tillie-Leblond, I.; Tonnel, A.B.; Jaubert, F.; Scheinmann, P.; Gosset, P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.** 2004; 113:94-100.
23. de Magalhaes Simões, S.; Santos, M.A.; Silva, O.M.; Fontes, E.S.; Fernezlian, S.M.; Garippo, A.L.; Castro, I.; Castro, F.F.M.; Martins, M.A.; Saldiva, P.H.N.; Mauad, T.; Dolhnikoff, M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. **Clin. Exp. Allergy** 2005; 35:602-611.
24. Douwes, J.; Gibson, P.; Pekkanen, J.; Pearce, N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. **Thorax** 2002; 57:643-648.
25. Ewart, S.L.; Mitzner, W.; DiSilvestre, D.A.; Meyers, D.A.; Levitt, R.C. Airway hyperresponsiveness to acetylcholine: segregation analysis and evidence for linkage to murine chromosome 6. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 1996; 14:487-495.

26. Fredberg, J.J.; Stamenovic, D. On the imperfect elasticity of lung tissue. **J. Appl. Physiol.** 1989; 67:2408-2419.
27. Fulkerson, P.C.; Rothenberg, M.E.; Hogan, S.P. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. **Clin. Exp. Allergy** 2005; 35:1251-1253.
28. Godard, P.; Chanez, P.; Siraudin, L.; Nicoloyannis, N.; Duru, G. Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. **Eur. Respir. J.** 2002; 19:61-67.
29. Godfrey, R.W.; Lorimer, S.; Majumdar, S.; Adelroth, E.; Johnston, P.W.; Rogers, A.V.; Johansson, A.S.; Jeffery, P.K. Airway and lung elastic fibre is not reduced in asthma nor in asthmatics following corticosteroid treatment. **Eur. Respir. J.** 1995; 8:922-927.
30. Herz, U.; Braun, A.; Ruckert, R.; Renz, H. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. **Clin. Exp. Allergy** 1998; 28:625-634.
31. Herz, U.; Renz, H.; Wiedermann, U. Animal models of type I allergy using recombinant allergens. **Methods** 2004; 32:271-280.
32. Hogan, S.P.; Koskinen, A.; Matthaei, K.I.; Young, I.G.; Foster, P.S. Interleukin-5-producing CD4⁺ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1998; 157:210-218.
33. Holgate, S.; Holloway, J.; Wilson, S.; Bucchieri, F.; Puddicombe, S.; Davies, D. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. **Proc. Am. Thorac. Soc.** 2004; 1: 93–98.
34. Humbles, A.A.; Lloyd, C.M.; McMillan, S.J.; Friend, D.S.; Xanthou, G.; McKenna, E.E.; Ghiran, S.; Gerard, N.P.; Yu, C.; Orkin, S.H.; Gerard, C. A critical role for

- eosinophils in allergic airways remodeling. **Science** 2004; 305:1776-1779.
35. Ingram, J.L.; Rice, A.; Geisenhoffer, K.; Madtes, D.K.; Bonner, J.C. Interleukin-13 stimulates the proliferation of lung myofibroblasts via a signal transducer and activator of transcription-6-dependent mechanism: a possible mechanism for the development of airway fibrosis in asthma. **Chest** 2003; 123:422-424.
36. in't Veen, J.C.; Smits, H.H.; Hiemstra, P.S.; Zwinderman, A.E.; Sterk, P.J.; Bel, E.H. Lung function and sputum characteristics of patients with severe asthma during an induced exacerbation by double-blind steroid withdrawal. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1999; 160:93-99.
37. James, A.L.; Maxwell, P.S.; Pearce-Pinto, G.; Elliot, J.G.; Carroll, N.G. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 166:1590-5.
38. James, A.L.; Pare, P.D.; Hogg, J.C. The mechanics of airway narrowing in asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.** 1989; 139(1):242-246.
39. Jatakanon, A.; Uasuf, C.; Maziak, W.; Lim, S.; Chung, K.F.; Barnes, P.J. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1999; 160:1532-1539.
40. Jeffery, P.K.; Godfrey, R.W.; Adelroth, E.; Nelson, F.; Rogers, A.; Johansson, S.A. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. **Am. Rev. Respir. Dis.** 1992; 145:890-899.
41. Jeffrey, P.K. Pathology of asthma. **British Medical Bulletin** 1992; 48: 23-39.
42. Katzenstein, A.L. Pathogenesis of "fibrosis" in interstitial pneumonia. An electron microscopy study. **Hum. Path.** 1985; 16: 1015-1024.

43. Kay, A.B. Pathology of Mild, Severe, and Fatal Asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1996; 154:566-569.
44. Kips, J.C.; O'Connor, B.J.; Langley, S.J.; Woodcock, A.; Kerstjens, H.A.; Postma D.S.; Danzig, M.; Cuss, F.; Pauwels, R.A. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2003; 167:1655-1659.
45. Kobayashi, S.D.; Voyich, J.M.; Burlak, C.; De Leo, F.R. Neutrophils in the innate immunity. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)** 2005; 53:505-517.
46. Kochi, T.; Okubo, S.; Zin, W.A.; Milic-Emili J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. **J. Appl. Physiol.** 1988; 64: 441-450.
47. Kumar, R.K.; Foster, P.S. Modeling Allergic Asthma in Mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 2002; 27:267-272.
48. Kurashima, K.; Fujimura, M.; Matsuda, T.; Kobayashi, T. Surface activity of sputum from acute asthmatic patients. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1997; 155:1254-1259.
49. Lambert, R.K.; Wiggs, B.R.; Kuwano, K.; Hogg, J.C.; Pare, P.D. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. **J. Appl. Physiol.** 1993; 74:2771-2781.
50. Leckie, M.J.; Brinke, A.; Khan, J.; Diamant, Z.; O'Connor, B.J.; Walls, C.M.; Mathur, A.K.; Cowley, H.C.; Chung, K.F.; Djukanovic, R.; Hansel, T.T.; Holgate, S.T.; Sterk, P.J.; Barnes, P.J. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. **Lancet** 2000; 356:2144-2148.
51. Lima, C.; Perini, A.; Garcia, M.L.; Martins, M.A.; Teixeira, M.M.; Macedo, M.S.

Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma.

Clin. Exp. Allergy 2002; 32:1659-1666.

52. Liu, M.; Wang, L.; Enhorning, G. Surfactant dysfunction develops when the immunized guinea-pig is challenged with ovalbumin aerosol. **Clin. Exp. Allergy** 1995; 25:1053-1060.

53. Liu, M.; Wang, L.; Li, E.; Enhornig, G. Pulmonary surfactant given prophylactically alleviates an asthma attack in guinea-pigs. **Clin. Exp. Allergy** 1996; 26:270-275.

54. Lopez-Aguilar, J.; Romero, P.V. Effect of elastase pretreatment on rat lung strip induced constriction. **Respir Physiol.** 1998;113:239-246.

55. Masoli, M.; Fabian, D.; Holt, S.; Beasley, R. Global Initiative for Asthma (GINA) program: the global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy** 2004; 59:469-478.

56. Mauad, T.; Silva, L.F.F.; Santos, M.A.; Grinberg, L.; Bernardi, F.D.C.; Martins, M.A.; Saldiva, P.H.N.; Dolhnikoff, M. Abnormal Alveolar Attachments with Decreased Elastic Fiber Content in Distal Lung in Fatal Asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2004; 170:857-862.

57. Mauad, T.; Xavier, A.C.G.; Saldiva, P.H.N.; Dolhnikoff, M. Elastosis and Fragmentation of Fibers of the Elastic System in Fatal Asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1999; 160:968-975.

58. McMillan, S.J.; Lloyd, C.M. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. **Clin. Exp. Allergy** 2004; 34:497-507.

59. Miranda, C.; Busacker, A.; Balzar S, Trudeau, J.; Wenzel, S.E. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic

- inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.** 2004; 113:101-108.
- 60 .Mojtabavi, N.; Dekan, G.; Stingl, G.; Epstein, M.M. Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. **J. Immunol.** 2002; 169:4788-4796.
61. Montes, G.S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic system. **Cell. Biol. Int.** 1996; 20: 15-27.
62. Moretto, A.; Dallaire, M.; Romero, P.; Ludwig, M. Effect of elastase on oscillation mechanics of lung parenchymal strips. **J. Appl. Physiol.** 1994; 77:1623-1629.
63. Mortola, J.P.; Noworaj, A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. **J. Appl. Physiol.** 1983; 55:250-253.
64. Mukaiyama, O.; Morimoto, K.; Nosaka, E.; Takahashi, S.; Yamashita, M. Involvement of enhanced neurokinin NK3 expression in the severe asthma guinea pig model. **Eur. J. Pharmacol.** 2004; 498:287-294.
65. Myers, J.L.; Katzenstein, A.L. Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia. **Chest** 1989; 94: 1309-1311.
- 66 .Nagase, T.; Moretto, A.; Ludwig, S. Airway and tissue behavior during induced constriction in rats: intravenous vs. aerosol administration. **J. Appl. Physiol.** 1994; 76:830-838.
- 67 .Noonan, M.; Chervinsky, P.; Busse, W.W.; Weisberg, S.C.; Pinnas, J.; De Boisblanc, B.P.; Boltansky, H.; Pearlman, D.; Repsher, L.; Kellerman, D. Fluticasone propionate reduces oral prednisone use while it improves asthma control and quality of life. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1995; 152:1467-1473.
- 68 .Payne, D.N.; Adcock, I.M.; Wilson, N.M.; Oates, T.; Scallan, M.; Bush, A. Relationship between exhaled nitric oxide and mucosal eosinophilic

- inflammation in children with difficult asthma, after treatment with oral prednisolone. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2001; 164:1376-1381.
69. Petak, F.; Hantos, Z.; Adamicza, A.; Azstalos, T.; Sly, P.D. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. **J. Appl. Physiol.** 1997; 82:1479-1487.
70. Pretolani, M.; Ruffie, C.; Joseph, D.; Campos, M.G.; Chuch, M.K.; Lefort, J.; Vargaftig, B.B. Role of eosinophil activation in the bronchial reactivity of allergic guinea pigs. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1994;149:1167-1174.
71. Qutayba, H. Gross pathology and histopathology of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.** 2003; 111:431-432.
72. Ramos-Barbon, D.; Ludwig, M.S.; Martin, J.G. Airway remodeling: lessons from animal models. **Clin. Rev. Allergy Immunol.** 2004; 27:3–21.
73. Roberts, C.R. Is asthma a fibrotic disease? **Chest** 1995; 107:111S-117S.
74. Rocco, P.R.; Negri, E.M.; Kurtz, P.M.; Vasconcellos, F.P.; Silva, G.H.; Capelozzi, V.L.; Romero, P.V.; Zin, W.A. Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2001; 164:1067-1071.
75. Romero, P.V.; Zin, W.A.; Lopez-Aguilar, J. Frequency characteristics of lung tissue strip during passive stretch and induced pneumoconstriction. **J. Appl. Physiol.** 2001; 91:882-890.
76. Salerno, F.G.; Ludwig, M.S. Dissociation between hysteresivity and tension in constricted tracheal and parenchymal strips. **J. Appl. Physiol.** 1998; 85:91-97.
77. Seow, C.; Schellenberg, R.; Paré, P.D. Structural and Functional Changes in the Airway Smooth Muscle of Asthmatic Subjects. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**

- 1998; 158:179-186.
78. Serra-Batlles, J.; Plaza, V.; Morejou, E.; Cornella, A.; Bruges, J. Costs of asthma according to the degree of severity. **Eur. Respir. J.** 1998;12:1322–1326.
79. Teeter, J.G.; Bleecker, E.R. Relationship between airway obstruction and respiratory symptoms in adult asthmatics. **Chest.** 1998; 113:272-277.
80. Ten Brinke, A.; Zwinderman, A.H.; Sterk, P.J.; Rabe, KF, Bel, E.H. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2001; 164:744-748.
81. Ward, C.; Johns, D.P.; Bish, R.; Pais, M.; Reid, D.W.; Ingram, C.; Feltis, B.; Walters, E.H. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2001;164: 1718–1721.
82. Weibel, E.R. Morphometry: stereological theory and practical methods. **Models of lung disease-microscopy and structural methods.** 1990; Marcel Dekker, New York, pp. 199–247
83. Weigert, C. Über eine methode zur farbung elastischer fasern. **Zentralbl Allg. Pathol. Anat.** 1898;9:289-292.
84. Wenzel, S.E. Severe asthma in adults. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2005; 172:149-160.
85. Wenzel, S.E.; Schwartz, L.B.; Langmack, E.L.; Halliday, J.L.; Trudeau, J.B.; Gibbs, R.L.; Chu, H.W. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. **Am J Respir Crit Care Med** 1999; 160:1001-1008.
86. Wenzel, S.E.; Schwartz, L.B.; Langmack, E.L.; Halliday, J.L.; Trudeau, J.B.; Gibbs, R.L.; Chu, H.W. Evidence that severe asthma can be divided

- pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 1999; 160:1001-1008.
87. Whitehead, G.S.; Walker, J.K.L.; Berman, K.G.; Foster, W.M.; Schwartz, D.V. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.** 2003; 285:32-42.
88. Wilder, J.A.; Collie, D.D.S.; Wilson, B.S.; Bice, D.E.; Lyons, C.R.; Lipscomb, M.F. Dissociation of Airway Hyperresponsiveness from Immunoglobulin E and Airway Eosinophilia in a Murine Model of Allergic Asthma. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 1999; 20:1326-1334.
89. Wills-Karp, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **Immunol. Rev.** 2004; 202:175-190.
90. Xisto, D.G.; Farias, L.L.; Ferreira, H.C.; Picanço, M.R.; Amitrano, D.; Lapa e Silva, J.R.; Neri, E.M.; Mauad, T.; Carnielli, D.; Silva, L.F.; Capelozzi, V.; Faffe, D.S.; Zin, W. A; Rocco, P.R.M. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 2005; 171: 829-837
91. Ying, S.; Meng, Q.; Smith, S.J.; Larché, M.; Robinson, D.S.; Kay, A.B. Methods for identifying human eosinophils in blood and tissues. **Allergy Clin. Immunol Int.** 2002; 14:64-71.
92. Yuan, H.; Ingenito, E.P.; Suki, B. Dynamic properties of lung parenchyma: mechanical contributions of fiber network and interstitial cells. **J. Appl. Physiol.** 1997; 83:1420-1431.
93. Yuan, H.; Konovov, S.; Cavalcante, F.S.; Lutchen, K.R.; Ingenito, E.P.; Suki, B. Effects of collagenase and elastase on the mechanical properties of lung tissue strips. **J. Appl. Physiol.** 2000; 89:3-14.

94. Zhu, Z.; Homer, R.J.; Wang, Z.; Chen, Q.; Geba, G.P.; Wang, J.; Zhang, Y.; Elias, J.A. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **J. Clin. Invest.** 1999; 103:779-788.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)