

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Inflamação Alérgica Modifica o Fenótipo e a Funcionalidade  
de Fibroblastos Pulmonares em Cultura 3-D**

**DIANA DALZY VIVEIROS**

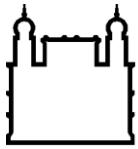
**RIO DE JANEIRO**

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**DIANA DALZY VIVEIROS**

**Inflamação Alérgica Modifica o Fenótipo e a Funcionalidade  
de Fibroblastos Pulmonares em Cultura 3-D**

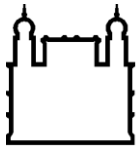
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de  
concentração em Imunologia e Farmacologia.

**Orientador: Dr. Marco Aurélio Martins**

**Co-orientadora: Dra. Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues**

**RIO DE JANEIRO**

2010



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**DIANA DALZY VIVEIROS**

**Inflamação Alérgica Modifica o Fenótipo e a Funcionalidade  
de Fibroblastos Pulmonares em Cultura 3-D**

**ORIENTADOR: Dr. Marco Aurélio Martins**

**CO-ORIENTADORA: Dra. Sandra Aurora Chavez Perez Rodrigues**

**Aprovada em: 23/03/2010**

**EXAMINADORES:**

**Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto (Fiocruz) – Presidente**

**Dr. Samuel dos Santos Valença (UFRJ)**

**Dra. Christianne Bandeira de Melo (UFRJ)**

**Dr. Vinicius de Frias Carvalho (Fiocruz)**

**Dra. Josiane Sabbadini Neves (UFRJ)**

Rio de Janeiro, 23 de março de 2010.

Sempre e nunca em excesso, à minha  
querida mãe Rosilda Dalzy.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho deve muito a algumas pessoas, por diferentes razões. Mas em primeiro lugar, preciso agradecer a Deus que nos concede a cada dia novas oportunidades de sermos melhores e que tem dado a mim todas as coisas: uma família maravilhosa, bons amigos e serenidade; agradeço ainda por todas as bênçãos concedidas e por mais esta etapa concluída.

Agradeço de forma especial aos meus orientadores por todo incentivo e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho. Ao Dr. Marco Aurélio Martins por sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de conduzir este trabalho, creio que deram norte a esta dissertação, facilitando o alcance dos objetivos propostos. À Dra. Sandra Aurora pelo carinho, atenção, incentivo, e por seus ensinamentos científicos.

À Dra. Patrícia Silva por seu exemplo de dedicação, organização e conhecimento.

Ao Dr. Renato Cordeiro pelo exemplo de dedicação à ciência.

À Dra. Luciana Garzoni por ter me ensinado a trabalhar com os esferóides e por toda ajuda inicial.

À Dra. Maria Isabel Doria Rossi pela revisão criteriosa dessa dissertação.

À dona Osirene, ou melhor, à Dadazinha pelo carinho e pelos muitos “puxões de orelha”. Sem dúvida alguma, meu trabalho seria muitíssimo mais difícil sem você.

À Andressa Moraes pela amizade, por nossas conversas divertidas (ou melhor, por seus monólogos), por cuidar das minhas células com carinho todas as vezes que precisei e pela boa vontade em ajudar nos meus experimentos, ainda que fossem em um final de semana.

À Patrícia Trentin, a amiga mais queridinha do mundo, por todo apoio e ajuda durante todo esse tempo.

À Pri Olsen por estar sempre disposta a me ensinar e tirar minhas dúvidas, pela amizade e por me encorajar sempre que eu estava meio desanimada.

À Suzana Cardoso, Bianca Ciambarella, Ana Carol Arantes, Thiago José, Luciana Coelho e Tati Paula pela ajuda, por todo apoio e também por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido.

À Lígia Paiva pela amizade, por toda ajuda durante os experimentos e também por nossas conversas e risadas.

A todos do Laboratório de Inflamação que participaram direta ou indiretamente desse trabalho e que tornaram a rotina do laboratório mais dinâmica e divertida: Adriano Vinícius Oliveira (Grande figura!), Aline Vieira (Sua boa vontade em ajudar a todos é incrível!), Amanda Cotias, Ana Lucia Pires, Caio França (É sempre bom poder contar com sua sinceridade!), Camila Carolina Cruz, Camila Pão, Carol Athar, Dani Matheus, Daniella Insuela, Davidson Dias, Edna Valotta, Elaine Sant'Anna, Francisco Alves, Gina de Castro, Jorge Silva, Magda Fráguas, Patricia

Jurgilas, Rafael Torres, Rodrigo Azevedo, Tatiane Pinto, Vanessa do Rosário, Vinícius de Frias.

Aos ex-integrantes do Laboratório de Inflamação que seguiram outros caminhos, mas que foram importantes durante os últimos dois anos: Carol Reigada, Aline Guimarães, Sabrina Lucena, Tati Peres, Arthur Tenório, Graziela Mello. Agradeço em especial à Thaiza Gomes e Patrícia Braga por terem me recebido tão bem assim que cheguei ao laboratório, pela amizade, pelos ensinamentos iniciais e por terem contribuído de forma intensa em parte dos dados apresentados nesse trabalho. Vocês são muito especiais e fazem muita falta por aqui!

A todos os integrantes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial a Danielle Lobato.

A minha amiga-irmã (porque “existem amigos mais chegados que um irmão”) Maria Carolina por sua amizade, por me fazer enxergar o lado bom das coisas, por me matar de rir com suas teorias sobre a vida, pelo grande incentivo, pela torcida e por sempre estar comigo nos momentos bons e difíceis também, mas especialmente por me ouvir.

Às minhas amigas Carla Soares, Joyce Gonçalves, Paula Azevedo, Ana Paula Santos e Amanda Regina pelo apoio incondicional nas horas difíceis, pela torcida, pelo carinho, por nossas risadas e pela compreensão relativa à minha ausência nos últimos tempos.

À tia Rosa e Regina pelo carinho, pelo incentivo e principalmente, por suas orações.

Aos meus irmãos Daniel e Danielly, pelo apoio e companhia indispensáveis. Amo vocês!

A minha sobrinha Isabella Cristina e ao meu sobrinho João Pedro – os mais fofos e lindos do mundo. Nada permaneceu igual no mundo após essas figurinhas. Tudo ficou mais bonito!

Agradeço a minha mãe Rosilda, a pessoa mais importante da minha vida - que ajuda a fazer mais tranqüila e segura a caminhada, pelo amor, pela dedicação, por sua paciência, por seus sacrifícios feitos para me dar o melhor, por estar sempre presente na minha vida nos momentos de alegria e de dificuldades. Ao meu pai, que juntamente a minha mãe me ensinou, com seus exemplos, o caminho do bem, por todo apoio e incentivo. Amo vocês!

“Tudo é uma questão de manter a mente quieta,  
a espinha ereta e o coração tranqüilo”.

Walter Franco

"Não acredite no que os teus olhos te dizem, tudo o que eles mostram é limitação.  
Olhe com o entendimento, descubra o que já sabes, e verás como voar!"

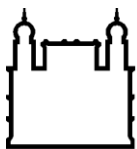
Richard Bach, do livro Fernão Capelo Gaiivota



## ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA.....	ii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Asma.....	01
1.1.1. Remodelamento das vias aéreas.....	03
1.1.2. Fibroblastos e Miofibroblastos.....	06
1.1.3. Modelos experimentais de asma.....	10
1.1.4. Modelos animais <i>in vivo</i> .....	10
1.1.5. Modelos experimentais <i>in vitro</i> .....	11
1.2. Sistemas tridimensionais de cultivo celular.....	12
1.2.1. Tecnologias de cultivo de esferóides celulares.....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 - Objetivos específicos.....	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Protocolo de sensibilização e desafio antigênico.....	17
3.3. Histologia.....	18
3.4. ELISA.....	19
3.5. Ensaio de detecção de peroxidase de eosinófilos (EPO).....	19
3.6. Análise quantitativa de colágeno.....	20
3.7. Cultura de fibroblastos pulmonares.....	20
3.8. Imunocitoquímica para $\alpha$ -actina de músculo liso.....	21
3.9. Sistema de cultivo tridimensional de fibroblastos pulmonares.....	21
3.10. Ensaio de proliferação.....	22
3.11. Imunofluorescência no esferóide inteiro.....	22

3.12. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51



Ministério da Saúde

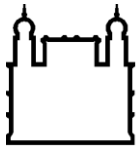
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **RESUMO**

#### **INFLAMAÇÃO ALÉRGICA MODIFICA O FENÓTIPO E A FUNCIONALIDADE DE FIBROBLASTOS PULMONARES EM CULTURA 3-D**

A fibrose subepitelial é uma característica marcante do remodelamento pulmonar observado na asma. Esse fenômeno está fortemente relacionado ao declínio da função pulmonar, mas sua base mecânica é ainda pouco compreendida. Uma vez que os fibroblastos pulmonares são as principais células estruturais que orquestram o remodelamento fibrótico na asma, neste estudo comparamos as alterações morfológicas e funcionais de fibroblastos pulmonares de camundongos saudáveis e asmáticos, cultivados em um arranjo celular tridimensional organizado (esferóides). A ideia central foi a obtenção de esferóides de fibroblastos pulmonares como um sistema alternativo para o estudo do remodelamento do tecido pulmonar *in vitro*. Camundongos Balb/c foram desafiados com ovoalbumina ou salina três vezes por semana durante duas semanas consecutivas, 30 dias após a sensibilização. Passadas 24 h após a última provocação antigênica, células resultantes da digestão pulmonar foram cultivadas, e uma cultura homogênea de fibroblastos pulmonares foi obtida (em terceira passagem) e, cultivada em placas de 96 poços tratadas com agarose, na presença ou ausência de IL-13 (10-80 ng/mL). A fibrose subepitelial, o infiltrado leucocitário, a liberação de citocinas, a produção de colágeno, e fibronectina foram avaliados através de colorações específicas, ELISA, Sircol e imunomarcagem, respectivamente. Observamos que a provocação alérgica conduz a uma marcada resposta inflamatória pulmonar predominantemente eosinofílica, e sinais expressivos de remodelamento das vias aéreas e deposição de proteínas de matriz. Essas mudanças foram acompanhadas pela elevação dos níveis de IL-13, eotaxina-1, IL-4 e IL-5, mensuradas em amostras de tecido pulmonar. Nós também observamos que fibroblastos obtidos de camundongos saudáveis (pulmão controle) ou camundongos ativamente sensibilizados e desafiados (pulmão remodelado) formaram esferóides em 24 h de cultivo. Esferóides de fibroblastos de pulmão controle apresentaram menor tamanho e expressaram menos componentes de matriz (fibronectina e colágeno), quando comparados a esferóides de pulmões remodelados. Interessantemente, esferóides controle expostos à IL-13 assemelharam-se àqueles formados por fibroblastos de pulmões remodelados, particularmente em relação à maior geração de fibronectina, colágeno e eotaxina-1. Em conclusão, estes resultados mostram que o cultivo de esferóides formados por fibroblastos pulmonares de camundongos antigenicamente desafiados exibem diferenças fenotípicas e morfológicas, relacionadas ao reparo tecidual e remodelamento das vias aéreas, reforçando a ideia de que mudanças adquiridas por fibroblastos durante eventos de remodelamento possam persistir em gerações futuras dessas células, contribuindo para a patogênese da asma.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **ABSTRACT**

#### **ALLERGIC INFLAMMATION MODIFIES THE PHENOTYPE AND FUNCTIONALITY OF LUNG FIBROBLASTS IN 3D-CULTURE**

Subepithelial fibrosis is a prominent feature of lung remodeling in asthma of all severities. The phenomenon strongly correlates with decline in lung function, but the mechanistic basis of it remains poorly understood. Since lung fibroblasts are major structural cells orchestrating fibrotic remodeling in asthma, we have here studied and compared the morphological and functional changes of lung fibroblasts, from normal and “asthmatic” mice, cultured in a three-dimensional organized cellular arrangement (spheroids). The central idea was to have lung fibroblast spheroids as an alternative system to study lung tissue remodeling in vitro. Sensitized Balb/C mice were challenged with ovalbumin or saline three times a week for two consecutive weeks, starting 30 days post-sensitization. 24 h after last provocation, digested lung cells were cultured, and homogenous lung fibroblasts (obtained in three passages) were eventually plated on agarose coated 96-well plastic dishes, without/with IL-13 (10-80 ng/ml). Subepithelium fibrosis, leukocyte infiltration, cytokine release, collagen and fibronectin production were assessed by specific staining, ELISA, Sircol and immunostaining, respectively. We found that allergen provocation led to marked lung inflammatory response predominantly eosinophilic, and expressive signs of airway remodeling and matrix protein deposit. These changes were accompanied by elevation in IL-13, eotaxin-1, IL-4 and IL-5 levels, measured in lung tissue samples. We also noted that lung fibroblasts obtained from healthy mice (control lung) or actively sensitized and challenged mice (remodeled lung) consistently evolved to spheroid clusters within 24 h of culture. Spheroids from fibroblasts from control lungs were found to be smaller and expressed less matrix components (fibronectin and collagen) as compared to those from remodeled lungs. Interestingly, exposure to IL-13 made spheroid from controls appear quite similar to those formed with fibroblasts from remodeled lungs, particularly concerning fibronectin, collagen and eotaxin-1 generation. In conclusion, these findings show that cultured spheroid formed by lung fibroblasts coming from allergen-challenged mice exhibit phenotype and functional differences, related to repair and airway remodeling, reinforcing the view that changes acquired by fibroblast experiencing remodeling events may persist in future generations of these cells, what could contribute to the pathogenesis of asthma.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO - 5-lipoxigenase  
 $\alpha$ -SMA - alfa-actina de músculo liso  
AMT- 3-amino-1,2,4-triazol  
BSA - albumina bovina  
CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório  
CPM - contagem por minuto  
CXCR4 - receptor de  $\alpha$ -quimiocinas 4  
ECP - proteína catiônica eosinofílica  
EDN - neurotoxina derivada de eosinófilos  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
EGF - fator de crescimento epidermal  
EMT - transição epitelial-mesenquimal  
EPO - enzima peroxidase do eosinófilo  
ET-1 - endotelina-1  
FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos-2  
FSP-1 - proteína específica de fibroblasto-1  
H&E - hematoxilina-eosina  
IGF-1 - “insulin-like growth factor-1”  
IgE - imunoglobulina E  
HB-EGF - “heparin-binding epidermal growth factor”  
IL-4 - interleucina-4  
IL-5 - interleucina-5  
IL-8 - interleucina-8  
IL-13 - interleucina-13  
rmIL-13 - recombinante murino de IL-13  
MBP - proteína básica principal  
MCP-1 - proteína quimioatraente de monócitos-1  
MEC - matriz extracelular  
MIP-1 $\alpha$  - proteína inibidora de macrófago-1 $\alpha$   
MMPs - metaloproteinases de matriz  
NF $\kappa$ B - fator nuclear  $\kappa$ B  
OPD - o-phenildiamino dihidrocloreto  
PBS - salina tamponada com fosfatos  
PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR- $\beta$  - receptor de PDGF do tipo beta

PDGF BB - isoforma heterodimérica de PDGF formada por duas cadeias do tipo B

RANTES - "regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted"

RGD - arginina-glicina-ácido aspártico

SBF - soro fetal bovino

SCF - fator de crescimento celular

TBS - tampão tris-salina

TGF- $\beta$  - fator de crescimento de transformação  $\beta$

TIMPs - metaloproteinases do tecido

VEGF - fator de crescimento endotelial

## **1. Introdução**

### **1.1. Asma**

A asma é um grave problema de saúde pública. A doença afeta pessoas de todas as faixas etárias e, quando não controlada, pode ser fatal. A prevalência da asma tem aumentado nas últimas décadas, acometendo cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo (Masoli e cols., 2004). O Brasil é o 8º país em prevalência de asma. Segundo o DATASUS (Informações de Saúde – SUS), a doença foi a segunda causa de hospitalização no ano de 2001. Estima-se que o custo total com serviços públicos relacionados à asma no Brasil seja de 35 milhões de dólares por ano (Jardim & Nascimento, 2007).

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela obstrução reversível das vias aéreas, hiperreatividade brônquica e denso infiltrado inflamatório pulmonar, predominantemente eosinofílico. O processo é marcado pela produção aumentada de IgE, ativação mastocitária e uma polarização da resposta Th2 com elevação nos níveis de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, quimiocinas e remodelamento tecidual. Episódios recorrentes de tosse, sibilo, sensação de opressão torácica e falta de ar constituem os principais sintomas desta doença, os quais são reversíveis de forma espontânea ou após tratamento (Bousquet e cols., 2000; Bateman e cols.; 2008).

A asma é o resultado da interação entre vários fatores genéticos e ambientais. A maioria dos pacientes asmáticos apresenta uma resposta aguda de hipersensibilidade imediata a antígenos ambientais inalados (Folli e cols., 2008). O início desta resposta ocorre quando alérgenos que entram nas vias aéreas ultrapassam as barreiras do trato respiratório, e são reconhecidos, fagocitados, processados e apresentados pelas células dendríticas presentes no pulmão, via MHC de classe II. As células T CD4 específicas para este alérgeno que se encontram nas vias aéreas reconhecem o antígeno através do TCR (receptor de reconhecimento das células T). A apresentação do alérgeno por células dendríticas, juntamente com sinais co-estimulatórios, leva a uma rápida ativação

desses linfócitos (Cohn e cols., 2004). A ativação dos linfócitos T CD4 promove a diferenciação desta célula em subpopulações Th1 ou Th2, além de induzir a proliferação dessas células e a liberação de diversos mediadores inflamatórios. Os subtipos de linfócitos T CD4 são classificados em Th1 e Th2 de acordo com o perfil de citocinas liberados por essas células. O subtipo Th2 controla a resposta alérgica através da produção de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Renauld, 2001; Cohn e cols., 2004; Galli e cols., 2008).

Uma vez que as vias aéreas tenham sido sensibilizadas, a re-exposição à alérgenos conduz a uma reação de fase aguda, conhecida como reação alérgica de fase imediata ou reação de hipersensibilidade imediata tipo I. Em muitos indivíduos, esse processo pode ser seguido por uma reação de fase tardia (Vignola e cols., 2002; Galli e cols., 2008).

A fase imediata da reação alérgica é iniciada quando um indivíduo atópico previamente sensibilizado entra em contato com o alérgeno. Este antígeno se ligará às IgEs que se encontram associadas aos receptores específicos de alta afinidade FcεRI, situado nas membranas de mastócitos e basófilos. A ligação do alérgeno às IgEs promove a ativação dessas células com conseqüente degranulação. Assim, ocorre a liberação de histamina, produção de eicosanóides e espécies reativas de oxigênio que induzem contração das vias aéreas, secreção de muco e vasodilatação (Bousquet e cols., 2000).

A fase tardia da reação alérgica compreende eventos celulares e a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios e ocorre entre 6 e 9 h após o contato com o alérgeno. Essa fase envolve o recrutamento e a ativação de eosinófilos, células T CD4<sup>+</sup>, basófilos, neutrófilos e macrófagos. As células Th2 produzem citocinas inflamatórias que são capazes de amplificar a sua própria proliferação, de células B e eosinófilos, dando continuidade ao ciclo de ativação novamente (Busse & Rosenwasser, 2000).

Na asma, a parede das vias aéreas é infiltrada com células TCD4, e eosinófilos. Mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos são variavelmente aumentados em número. A neutrofilia é encontrada em casos de asma grave ou em exacerbações. No lúmen das vias aéreas, há a presença de muco repleto de



macrófagos ativados, linfócitos, eosinófilos e células epiteliais que se desprenderam do tecido danificado (Cohn e cols., 2004; Hamide & Tulic; 2009).

A inflamação persistente em pacientes com asma leva a alterações estruturais no parênquima pulmonar. Essas mudanças histopatológicas, coletivamente chamadas de remodelamento das vias aéreas, resultam da interação entre mediadores inflamatórios e células estromais (Cohn e cols., 2004).

### **1.1.1. Remodelamento das vias aéreas**

As doenças inflamatórias agudas são geralmente resolvidas através de processos de reparo que restauram a estrutura e as funções normais do tecido. Na asma crônica, este processo torna-se desordenado e o reparo é ineficaz conduzindo assim ao remodelamento de diversas estruturas pulmonares (Elias e cols., 1999; Tattersfield e cols., 2002). O remodelamento designa um conjunto de alterações na composição, quantidade e organização celular e molecular observada nas vias aéreas de pacientes asmáticos que ocorrem em função de um desequilíbrio entre regeneração e reparo tecidual (Cohn e cols., 2004; Bai, 2010). A inflamação e o remodelamento são processos interdependentes que influenciam claramente a evolução clínica da doença (Vignola e cols., 2003). Evidências sustentam a interpretação de que o remodelamento ocorra (ou persista) como resultado de um descontrole do processo inflamatório (Wilson & Bamford, 2001).

O remodelamento das vias aéreas na asma foi descrito pela primeira vez em 1922, por Hubert & Koessler, em casos de asma fatal. As alterações estruturais observadas nesse processo incluem a perda de integridade epitelial, espessamento da membrana basal, fibrose subepitelial, hiperplasia de células mucígenas, aumento da musculatura lisa e angiogênese (Roche e cols., 1989; Loyde & Robinson, 2004) (Figura 1.1).

Observações em pacientes asmáticos e em modelos animais sugerem que a metaplasia e hiperplasia epitelial representam uma expressão precoce de remodelamento. As alterações epiteliais na asma incluem descamação epitelial, perda de células ciliadas, hiperplasia das células caliciformes e hipersecreção de

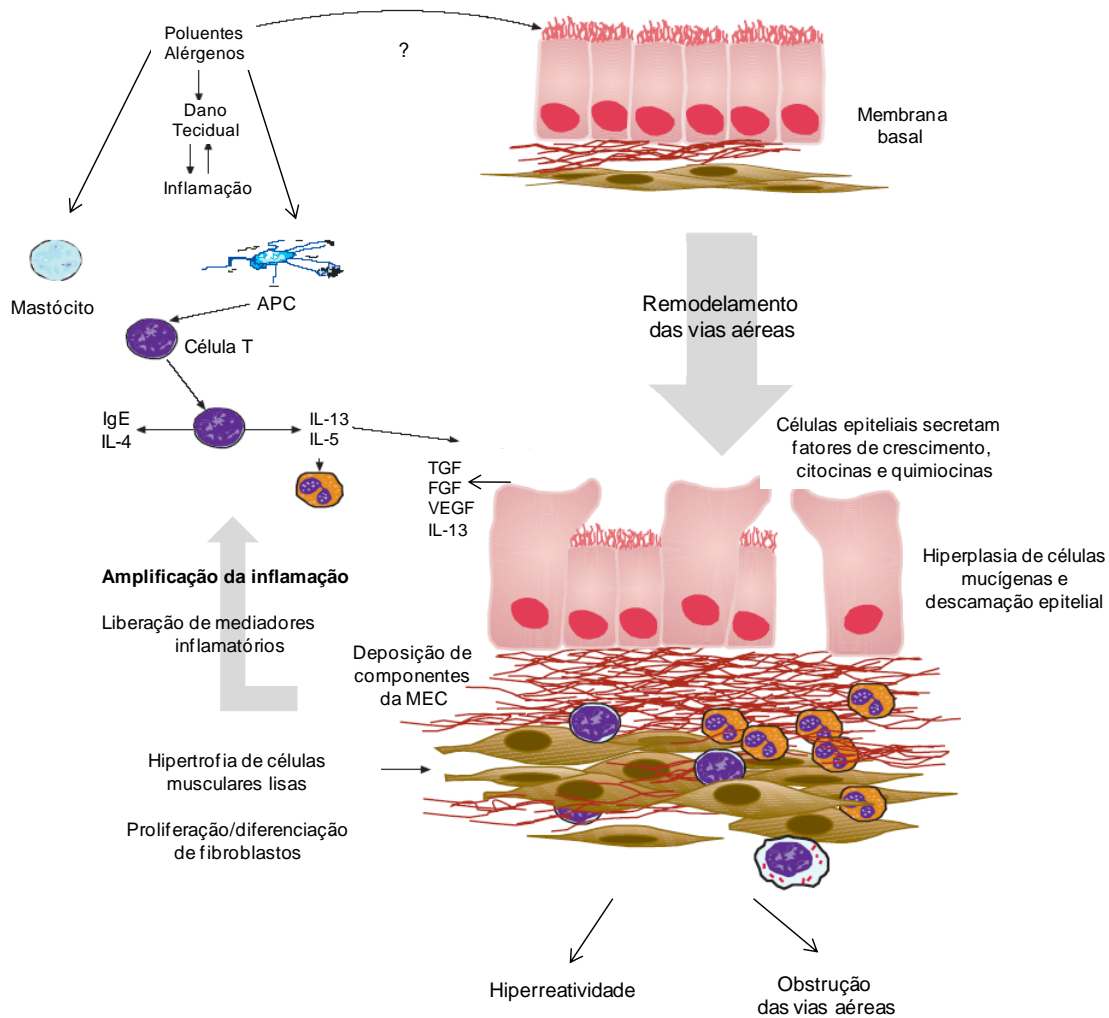
muco (Ordonez e cols., 2000). As células epiteliais podem ainda modular o processo de remodelamento através da produção de citocinas e fatores de crescimento que afetam a proliferação de fibroblastos e a produção de proteínas da MEC. Os principais mediadores liberados pelo epitélio que participam diretamente do remodelamento são TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, FGF, IGF-1, ET-1 e HB-EGF (Tagaya & Tamaoki, 2007). Clinicamente, a extensão da lesão epitelial está relacionada à hiperresponsividade das vias aéreas (Boulet e cols., 1997; Bai, 2010), o que sugere que o grau de perda/renovação do epitélio está relacionado com o desenvolvimento e a gravidade da asma.

A fibrose subepitelial é uma característica marcante do remodelamento tecidual observado na asma grave. A fibrose subepitelial ocorre na lamina reticular, logo abaixo da membrana basal. Esse processo é caracterizado pela acentuada deposição de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina, tenascina, colágeno tipo I, III e V por fibroblastos (Roche e cols., 1989; Royce e cols., 2009). A deposição de componentes da MEC nos tecidos é determinada pelo balanço entre a produção e a degradação de proteínas fibrilares. A degradação de MEC é regulada por metaloproteinases (MMPs), cuja atividade pode ser controlada por uma família de inibidores endógenos, coletivamente conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). O desequilíbrio entre a atividade de MMPs e TIMPs conduz freqüentemente a um remodelamento defeituoso, favorecendo o acúmulo de componentes da MEC e conseqüentemente a fibrose (Brew e cols., 2000). O aumento de componentes da MEC pode não somente levar a fibrose, mas também atuar como um reservatório de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Esses mediadores inflamatórios podem ser liberados rapidamente da MEC permitindo uma sinalização extracelular sem a necessidade de síntese protéica imediata, perpetuando assim a inflamação (Bergeron & Boulet, 2007; Burgess, 2009). Além disso, o espessamento da membrana basal correlaciona-se com a limitação ao fluxo de ar e a hiperreatividade brônquica (James e cols., 2001; Ward e cols., 2001; Kasahara e cols., 2002; Shiba e cols., 2002; Royce e cols., 2009).

Em asmáticos, a massa muscular das vias aéreas é aumentada devido à hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas. Inicialmente, essas células eram consideradas relevantes apenas no fenômeno de broncoconstrição, mas atualmente sabe-se que elas possuem igualmente funções imunomoduladoras cruciais. As células musculares lisas participam ativamente do processo inflamatório e do remodelamento tecidual através da liberação de citocinas, quimiocinas e proteínas da MEC, contribuindo para a progressão da doença asmática (Panettieri, 2002; Johnson, 2001).

As alterações vasculares observadas no processo de remodelamento tecidual na asma incluem o aumento da microvasculatura das vias aéreas e angiogênese (Li & Wilson, 1997). Esse fenômeno está associado ao aumento da expressão de fator de crescimento endotelial (VEGF) (Hoshino e cols., 2001). As conseqüências clínicas da angiogênese incluem uma maior propensão à formação de edema que contribui para o estreitamento das vias aéreas, e o aumento na distribuição de mediadores inflamatórios nos pulmões.

A gravidade da asma está relacionada ao remodelamento das vias aéreas, à redução da função pulmonar, na maior dificuldade em controlar-se satisfatoriamente os sintomas da doença, e ao subsequente aumento no uso de medicação sistêmica, freqüentemente associado a efeitos colaterais não menos graves (Ten Hacken e cols., 2003; Bumbacea e cols., 2004; Tang e cols., 2006; Locke e cols., 2007; Pare e cols., 2007). A compreensão dos eventos moleculares envolvidos no remodelamento das vias aéreas pode facilitar o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas para prevenir ou reverter a perda da função pulmonar observada na asma.



**Figura 1.1.** Remodelamento das vias aéreas na asma. A exposição a antígenos ambientais pode causar danos às vias aéreas, e indivíduos atópicos podem desenvolver uma resposta inflamatória persistente e, conseqüentemente remodelamento tecidual (adaptado de Lloyd CM & Robinson DS, 2007).

### 1.1.2. Fibroblastos e Miofibroblastos

As mudanças estruturais observadas na asma eram consideradas apenas como fenômenos secundários, conseqüentes da inflamação persistente (Lloyd & Robinson, 2007). Entretanto, a literatura atual propõe uma visão alternativa da patogênese da asma e enfatiza a importância do microambiente estromal no

próprio processo inflamatório. Assim, células de origem mesenquimal, como os fibroblastos, possuem um papel importante na manutenção da inflamação crônica observada na asma.

Os fibroblastos são células multifuncionais responsáveis pela homeostasia da matriz extracelular. Eles sintetizam e degradam continuamente um grupo diverso de moléculas extracelulares e seus receptores (Laurent e cols., 2007). Essas células possuem um variado repertório biossintético e são capazes de amplificar a inflamação devido à produção de quimiocinas, citocinas e de proteínas de MEC (Zhang e cols., 1996; Leslie e cols., 1992).

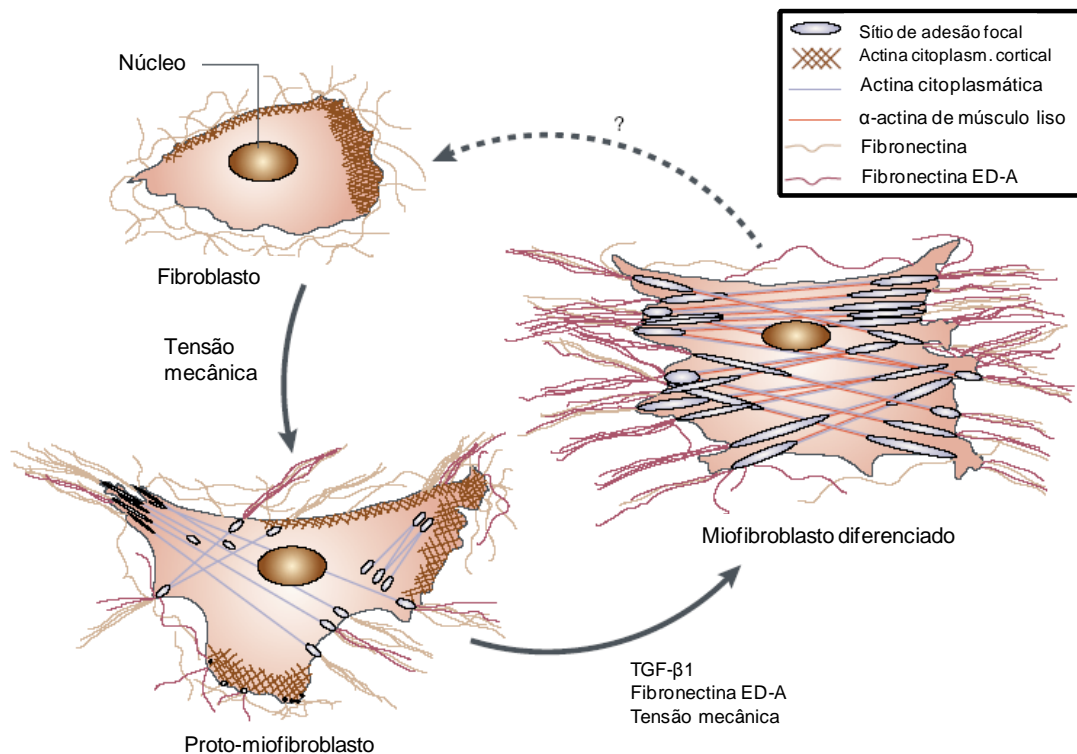
A principal atividade de fibroblastos ocorre em tecidos lesionados. Após a injúria tecidual, os fibroblastos migram para o local da lesão, proliferam e produzem componentes de matriz extracelular como colágeno e fibronectina, resultando na formação de um tecido de granulação. Simultaneamente, os fibroblastos adquirem um fenótipo miofibroblástico (Hinz, 2007; Hardie e cols., 2009). A finalização do processo de reparo normal implica na perda da contratilidade de miofibroblastos e diminuição de sua atividade de síntese, eventualmente acompanhada por uma dramática redução desse tipo celular por apoptose (Desmouliere e cols., 1995). Em doenças crônicas caracterizadas pela presença de fibrose, a apoptose não ocorre e os miofibroblastos continuam ativos no tecido (Desmouliere e cols., 2005; Gabbiane, 2003).

A diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos envolve o desenvolvimento de feixes contráteis. Essas fibras são inicialmente compostas por actina citoplasmática e são capazes de gerar uma pequena força de tração (Hinz e cols., 2001). Para diferenciá-los de fibroblastos quiescentes, fibroblastos ativado que passam a apresentar um aparato contrátil são chamados de proto-miofibroblastos (Tomasek e cols., 2002). Essa primeira mudança fenotípica ocorre em resposta a alterações na composição, organização, e propriedades mecânicas da matriz extracelular (Hinz & Gabbiani, 2003) e de citocinas localmente liberada por células inflamatórias e células residentes (Werner & Grose, 2003). O aumento da tensão na MEC resultante do processo de remodelamento leva a diferenciação de proto-miofibroblastos que passam a expressar  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). A

expressão de  $\alpha$ -SMA é precisamente controlada pela ação conjunta de fatores de crescimento como TGF $\beta$ -1 e de proteínas especializadas da MEC como a fibronectina ED-A (formada por “splicing” do domínio ED-A), assim como pela tensão isométrica imposta pela matriz extracelular (Tomasek e cols., 2002). A incorporação de  $\alpha$ -SMA às fibras de estresse marca a diferenciação final a miofibroblastos e aumenta significativamente a atividade contrátil dessas células (Figura 1.2) (Hinz e cols., 2001).

Diversos estudos têm considerado origens alternativas de fibroblastos na fibrose como diferenciação, proliferação ou migração de fibroblastos, ou ainda, transdiferenciação de células musculares e células epiteliais. Evidências indicam que progenitores mesenquimais derivados da medula óssea, denominados fibrócitos, funcionam como precursores de miofibroblastos e podem contribuir para a gênese da fibrose subepitelial na asma (Schmidt e cols., 2003; Nihlberg e cols., 2006; Lama & Phan, 2006). Os fibrócitos representam de 0,1% - 0,5% das células na circulação sanguínea periférica e podem ser identificados pela expressão de CD45, CD34, colágeno I, CXCR4 e  $\alpha$ -SMA (Phillips e cols., 2004; Gomperts & Strieter, 2007; Wang e cols., 2008). Estudos demonstram que em pacientes e em diversos modelos *in vivo* de asma alérgica, o processo de reparo e regeneração do tecido pulmonar envolve o recrutamento seletivo de fibrócitos para a mucosa brônquica, onde diferenciam-se a miofibroblastos (Chesney e cols., 1997; Schmidt e cols., 2003; Abe e cols., 2004). Schmidt e colaboradores mostraram que fibrócitos humanos circulantes adquirem um fenótipo miofibroblástico sob estimulação *in vitro* com endotelina (ET-1) e TGF- $\beta$ , citocinas fibrogênicas produzidas em quantidades exageradas em vias aéreas asmáticas. Adicionalmente, foi demonstrado que a ação conjunta de SCF e IL-13 exerce um importante papel no remodelamento das vias aéreas por promover o recrutamento de fibrócitos para os pulmões e induzir a diferenciação desses progenitores a miofibroblastos. Além disso, o tratamento com anticorpos neutralizantes específicos para SCF reduz significativamente o processo de remodelamento das vias aéreas e suprime o recrutamento de fibrócitos para os pulmões (Dolgachev e cols., 2009).

Um segundo mecanismo descrito para uma origem alternativa de miofibroblastos em condições fibróticas baseia-se na transição epitelial-mesenquimal (EMT), processo pelo qual células epiteliais transdiferenciam-se a fibroblastos/miofibroblastos (Scotton & Chambers, 2007; Eyden, 2008). Nesse processo células epiteliais perdem suas principais características fenotípicas e assumem algumas características mesenquimais. Assim essas células exibem uma perda na adesão célula-célula, aumento na motilidade e alterações morfológicas e passam a expressar vimentina,  $\alpha$ -SMA, desmina, e FSP-1 (proteína específica de fibroblastos-1). A expressão de FSP-1 tem sido descrita como um marcador de EMT (Eyden, 2008; Hardie e cols., 2009).



**Figura 1.2.** Diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos (adaptado de Tomasek e cols., 2002).

### **1.1.3. Modelos experimentais de asma**

Os mecanismos fisiológicos exatos do desenvolvimento da asma, em particular, a complexa interação entre células inflamatórias com células estruturais, como células musculares lisas, fibroblastos ou neurônios ainda não são totalmente compreendidos. Para melhor compreensão da doença e, posteriormente, desenvolvimento de novos medicamentos eficazes, o uso de modelos animais é essencial, assim como a utilização de modelos *in vitro* envolvendo cultura de células (Braun e cols., 2008).

### **1.1.4. Modelos animais *in vivo***

Os modelos animais *in vivo* oferecem informações valiosas sobre aspectos gerais da patologia e para o tratamento da asma. Os modelos murinos de inflamação alérgica têm sido úteis na definição da função de determinados mediadores ou células envolvidas nesse processo. Entretanto, a composição e a localização da inflamação em modelos experimentais de asma alérgica aguda diferem do processo observado em indivíduos com asma (Kips e cols., 2003; Fulkerson e cols., 2005).

Em geral, os modelos murinos de asma alérgica envolvem uma etapa inicial de sensibilização sistêmica com uma determinada proteína (ovoalbumina, por exemplo) conjugada a um adjuvante. Após algumas semanas, são feitos desafios locais, utilizando-se a mesma proteína alergênica (Lloyde e cols., 2001). Esses modelos tem sido úteis para elucidar os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento da inflamação e hiperreatividade das vias aéreas. Entretanto, esses protocolos com uma única sensibilização e desafio não induzem uma inflamação crônica ou alterações estruturais como as observadas na asma humana. Além disso, o fenômeno inflamatório e a AHR desaparecem após cessar as exposições ao antígeno (McMillan & Lloyde, 2004).

Mais recentemente, foram desenvolvidos modelos com longas rotinas de exposições antigênicas, muitas vezes envolvendo vários meses, objetivando-se a



reprodução de aspectos mais crônicos da asma. Geralmente esses modelos crônicos demonstram consideravelmente menos inflamação eosinofílica nos pulmões, entretanto, mostram evidências de remodelamento com aumento da deposição de colágeno e de musculatura lisa, além de hiperplasia de células caliciformes (Lloyde & Robinson, 2007).

#### **1.1.5. Modelos experimentais *in vitro***

Sistemas tradicionais de cultivo celular *in vitro* são importantes para delinear algumas funções de células inflamatórias e estruturais pulmonares. Diversos tipos celulares podem ser analisados *in vitro* como células dendríticas, mastócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, sejam em culturas unicelulares ou em co-cultura. Pode-se ainda analisar a função de células estruturais, como células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos. As células podem ser oriundas de linhagens celulares imortalizadas, comercialmente disponíveis ou ainda células de culturas primárias isoladas de espécimes cirúrgicos ou *post mortem*. O cultivo celular *in vitro* tem permitido examinar os efeitos de mediadores inflamatórios e pró-fibróticos sobre uma ampla gama de funções celulares como proliferação, secreção de mediadores, metabolismo de componentes da MEC e, secreção de proteases (Lloyde & Robinson, 2007).

Outra opção para estudos *in vitro* é a utilização de explantes de pulmão, no qual fragmentos pulmonares humanos ou de animais são removidos e cultivados por um período de dias ou semanas. Através da utilização de explantes pulmonares é possível avaliar efeitos imunomoduladores e compreender processos relacionados à asma no tecido. Comparado aos modelos de cultivo celular, a grande vantagem do uso de explantes de órgãos é a sua complexidade (Huang e cols., 2009).

## 1.2. Sistemas tridimensionais de cultivo celular

Nas últimas quatro décadas, sistemas de cultura 3D em esferóides têm sido aplicados em pesquisas biomédicas. Os pioneiros nessa área foram os embriologistas J. Holtfreter & A. Moscona que desenvolveram a metodologia de agregados celulares entre 1940 e 1950. Em 1971, essa metodologia foi adaptada por Sutherland e colaboradores para a pesquisa em câncer, onde o principal objetivo foi desenvolver um modelo *in vitro* adequado ao crescimento tumoral a ser aplicado em radiobiologia. Os agregados celulares foram denominados esferóides e vem sendo valorizados como estruturas funcionais relevantes por conservarem uma arquitetura tridimensional e funções celulares semelhantes às encontradas nos tecidos. Desde então, o espectro de investigações sobre esferóides multicelulares de tumores (MCTS) tem aumentado rapidamente e expandido para outras áreas da pesquisa biomédica e em biologia celular básica (Kunz-Schughart, 1999). Em comparação aos métodos de culturas celulares tradicionais, em suspensão ou em monocamadas, reagregados celulares em sistemas tridimensionais podem preservar características similares aos tecidos em organismos vivos, por exemplo, interações célula-célula e célula-matriz, que permitem estudos mais representativos sobre mecanismos celulares e teciduais (Cukierman e cols., 2001).

Nos tecidos de mamíferos, as células estão conectadas entre si e à matriz extracelular formando um complexo microambiente tridimensional. A matriz extracelular é formada por uma rede de proteínas estruturais como colágeno, elastina e proteínas adesivas como fibronectina e laminina que estão imersas em um gel de glicosaminoglicanos (GAG) e proteoglicanos (Burgess, 2009). O contato entre as células e a matriz extracelular, via integrinas, afeta muitas funções celulares tais como proliferação, diferenciação, migração, apoptose e morfologia. Entretanto, para estudar esses processos, as células são geralmente isoladas dos tecidos através de dissociação mecânica e/ou enzimática. Posteriormente, são cultivadas em monocamadas. Estes são sistemas bidimensionais (2D) e o substrato é geralmente uma superfície plana e rígida, como placas de plástico ou

vidro. Essa condição altera as interações entre as células, a matriz extracelular e o complexo organizacional de integrinas e moléculas do citoesqueleto, modificando a morfologia celular e influenciando diversas funções celulares. Em razão dessas observações, atualmente questiona-se até que ponto sistemas de cultura 2D representam situações que ocorrem em organismos vivos (Boudreau & Jones, 1999; Walpita & Hay, 2002; Rossi e cols., 2005 ).

Esferóides podem conter uma extensiva rede de matriz extracelular que difere em quantidade e organização da MEC observada em células cultivadas em monocamadas. Supõe-se que o ambiente tridimensional da cultura em esferóides induza o aumento da produção de componentes da MEC. Ademais, a composição da MEC parece ser diferentemente regulada em esferóides e células em monocamadas (Mueller-Klieser, 1997; Nederman e cols., 1984; De Lange Davies e cols., 1997). Glimelius e colaboradores (1988) demonstraram que esferóides formados por células oriundas de gliomas humanos apresentaram maior quantidade de proteoglicanos e fibronectina quando comparado à produção desses componentes observada em cultura convencional de monocamadas. A matriz extracelular também está envolvida na formação de esferóides. A interação entre fibronectina e integrinas é requerida para a agregação de fibroblastos humanos da derme em esferóides. A formação desses agregados mostrou-se dependente da interação dos domínios RGD de fibronectina com a integrina  $\alpha 5\beta 1$  e parece ser independente da integrina  $\alpha V$  (Salmenperä e cols., 2008).

Os modelos de cultivo tridimensionais são utilizados em uma ampla gama de estudos em biologia celular, incluindo biologia tumoral, mecanismos de adesão celular, migração, morfogênese, proliferação, diferenciação, apoptose e respostas imunes (Pampaloni e cols., 2007). Atualmente, enfatiza-se o potencial econômico e de predição de eficácia clínica da utilização de esferóides celulares na seleção preliminar de compostos mais ativos de um grande grupo de candidatos a novas drogas e para a substituição de alguns módulos de ensaios em animais (Friedrich e cols., 2009).

### **1.2.1. Tecnologias de cultivo de esferóides celulares**

Esferóides celulares são sistemas simples de cultivo tridimensional, que aproveitam a tendência natural de muitos tipos celulares em formar agregados. O princípio básico da formação de esferóides é a modulação das condições de cultivo, de forma que a interação das células com o substrato seja reduzida, favorecendo, assim, interações homotípicas célula-célula. Os esferóides podem ser obtidos de uma cultura unicelular ou de co-cultura (esferóides mono ou multicelulares, respectivamente) (Rossi e cols., 2005; Pamplone e cols., 2007).

A manipulação fácil e rápida tanto na etapa de cultivo quanto na fase de análise dos esferóides é essencial para a integração desse sistema em testes de rotina. Várias técnicas para o cultivo de esferóides têm sido descritas, enfatizando as suas vantagens e desvantagens individuais (Friedrich e cols., 2009). Os principais métodos para a obtenção de esferóides são:

#### **i) Sistema de cultura rotativa**

Nestes sistemas, as células são semeadas em agitadores giratórios, que se movem continuamente impedindo a adesão celular à superfície (Schwartz, 1992). Essa técnica fornece um sistema adequado para o cultivo em larga escala e para a manutenção de esferóides em condições ótimas de suprimento de nutrientes durante um longo período (Friedrich e cols., 2009).

#### **ii) Sistemas de cultura estacionária**

- Tecnologias de cultura estacionária incluem o crescimento de esferóides em placas de 96 poços com fundo arredondado onde a superfície é revestida com uma fina camada de substâncias não adesivas como agarose ou poli-hidróxi etil metacrilato (poli-HEMA) (Carlsson; 1984). Essa técnica permite a formação de um único e

uniforme esferóide por poço, garantindo alta reprodutibilidade aos ensaios.

- No método de gota pendente ou suspensão em gota (“hanging drop”), as células são centrifugadas em tubos cônicos. E posteriormente, a massa celular compactada é gentilmente transferida para placas de cultura (Timmins e cols., 2005; Kelm e cols., 2003). Essa metodologia resulta na formação de múltiplos esferóides que apresentam uma ampla variação em tamanho. E, portanto, exige uma seleção de esferóides com tamanhos semelhantes para obtenção de um grupo morfológicamente homogêneo.

Diversos métodos de análise, básicos ou complexos, são utilizados para a avaliação de esferóides celulares viáveis, fixados ou dissociados. Hoje, praticamente todos os instrumentos modernos de análise, incluindo técnicas moleculares, podem ser adaptados a cultura de esferóides (Kunz-Schughart e cols., 2004).

## 2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi a padronização de um sistema de cultivo tridimensional de fibroblastos pulmonares capaz de reproduzir características compatíveis ao remodelamento das vias aéreas observadas na asma crônica.

### 2.1. Objetivos específicos

- Estabelecer um modelo de inflamação e remodelamento pulmonar em camundongos Balb/C;
- Correlacionar aspectos centrais da inflamação e remodelamento das vias aéreas que ocorrem no modelo murino de asma crônica *in vivo*, ao sistema de cultura 3D *in vitro*;
- Investigar a responsividade do esferóide formado por fibroblastos pulmonares provenientes de pulmões saudáveis e de pulmões asmáticos, com ênfase na produção de fibronectina e colágeno, e na geração da quimiocina eotaxina-1.

### **3. Material e Métodos**

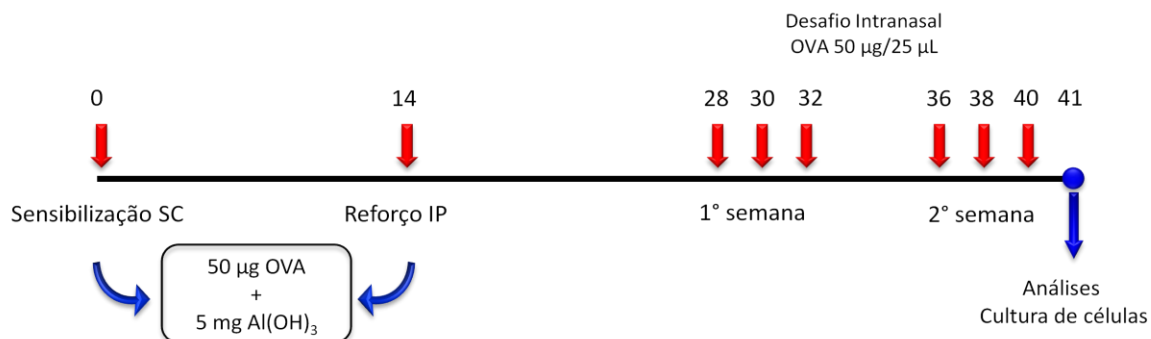
#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c, com 8 semanas de vida, acondicionados em grupos de seis animais por caixa, no biotério do Pavilhão Ozório de Almeida com temperatura e umidade controladas ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $50\pm 10\%$ , respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15 min/h. Os animais foram fornecidos pelo CECAL-FIOCRUZ, sendo que todos os procedimentos foram anteriormente aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Licença 00085-02).

#### **3.2. Protocolo de sensibilização e desafio antigênico**

A sensibilização ativa foi realizada através da injeção subcutânea dorsal de uma suspensão contendo salina e ovoalbumina (50  $\mu\text{g}$ ), emulsificada em 5 mg de gel de hidróxido de alumínio, em um volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Após 14 dias, os animais receberam um reforço antigênico intraperitoneal, utilizando-se a mesma suspensão.

Passados mais 14 dias os animais foram submetidos ao desafio antigênico através de instilação de uma solução salina contendo 50  $\mu\text{g}$  de ovoalbumina por via intranasal três vezes por semana durante duas semanas consecutivas. As soluções de ovoalbumina foram preparadas utilizando-se salina estéril (NaCl 0,9%), imediatamente antes do uso. O grupo controle foi representado por animais ativamente sensibilizados e desafiados com salina estéril (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Esquema do modelo de asma crônica em camundongos BALB/c.**

Os animais foram sensibilizados subcutaneamente no dia 0 com uma solução salina contendo 50 µg de ovoalbumina e 5 mg de hidróxido de alumínio. Quatorze dias depois, os animais receberam um reforço da sensibilização com ovoalbumina e hidróxido de alumínio por via intraperitoneal. Nos dias 28, 30, 32, 36, 38 e 40 os camundongos foram desafiados com 50 µg de ovoalbumina por via intranasal. Os animais controle foram desafiados com salina. As análises foram realizadas 24 h após o último desafio antigênico.

### 3.3. Histologia

Os animais foram sacrificados 24 h após o último desafio antigênico, através de uma injeção de pentobarbital (50 mg/kg). O pulmão direito foi fixado por injeção intratraqueal de formalina tamponada (10%) numa pressão constante de 25 cm H<sub>2</sub>O. Após toracotomia, os pulmões foram removidos e imersos em solução fixadora (solução de formalina tamponada), processados segundo a rotina do laboratório, incluídos de modo a se obter fragmentos do ápice, terço médio e base. Cortes de 4 µm foram corados em Hematoxilina & Eosina para a análise histopatológica e tricrômico de Gomori para análise da deposição de proteínas de matriz extracelular.



### **3.4. ELISA**

A produção das citocinas foi detectada através do ensaio Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Para a realização do ensaio, o anticorpo capturador (100 µL por poço) foi usado para recobrir a placa, a qual permaneceu incubada em temperatura ambiente por 18 h. A placa foi lavada e bloqueada para ligações inespecíficas com PBS/BSA 1 % (250 µL por poço), o qual permaneceu em contato com o anticorpo capturador durante 1 h. Após esta incubação ocorreu outra lavagem, seguida da adição das amostras e dos padrões com diluição seriada nas concentrações indicadas nos kits. Essa incubação permaneceu durante 1 h na temperatura de 4° C. A placa foi então lavada para adição do anticorpo de detecção conjugado com streptavidina-HRP, permanecendo incubado por 1 h. Após esse tempo, a placa foi lavada novamente e adicionou-se a enzima por 1 h. O substrato (K-Blue) foi adicionado e a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas concentrações indicadas nos kits. A leitura de DO foi feita no espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos por mg de tecido pulmonar ou pg/mL nas amostras de sobrenadante.

### **3.5. Ensaio de detecção de peroxidase de eosinófilos (EPO)**

Os pulmões foram removidos, canulados através da artéria pulmonar e perfundidos com 20 mL de salina/EDTA (20 mM). Os pulmões foram colocados em 5% de suspensão de HBSS (Solução balanceada de Hank's; pH 7.4; Sigma Chemical Co.) e macerados usando um triturador (T25 ultra - Tirrax). O homogenato resultante foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. As hemácias foram removidas por lise hipotônica. As células em suspensão foram então, novamente centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. As células foram ressuspensas em uma solução de HBSS contendo 0,05% de HTAB (hexadeciltrimetilamonio brometo; Sigma Chemical Co.). As células foram lisadas por choque térmico, em três etapas de congelamento

e descongelamento em nitrogênio líquido. A suspensão foi centrifugada, e o sobrenadante recolhido. As amostras foram plaqueadas e, em seguida foi adicionado o substrato (pH 8.0) contendo OPD (*o*-fenildiaminadiidrocloreto; Sigma Chemical Co.) na concentração de 1.5 mM e peróxido de hidrogênio 6.6 mM, diluídos em Tris-HCl (0.05 mM; pH 8.0). A reação foi interrompida após 30 minutos com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 M). A leitura de DO foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm (Strath e cols., 1985).

### **3.6. Análise quantitativa de colágeno**

O conteúdo de colágeno presente no tecido pulmonar ou no sobrenadante da cultura tridimensional foi analisado por meio de uma reação colorimétrica utilizando a técnica de Sircol (Biocolor, UK). O tecido pulmonar foi macerado em uma solução de Tris 0.05 M + NaCl 1M, e mantido por 18 horas a 4°C. Posteriormente, o material foi submetido à centrifugação de 10.000 x g por 1 hora a 4°C. Alíquotas de 20 µL do macerado do tecido pulmonar ou do sobrenadante dos esferóides foram incubadas com 1 mL do reagente Sirius Red durante 30 min em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, foram centrifugadas e o precipitado resultante foi solubilizado em reagente Alkaline por 10 minutos. A quantificação foi feita no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

### **3.7. Cultura de fibroblastos pulmonares**

Os camundongos Balb/c foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, 24 horas após o último desafio antigênico. Após toracotomia, em condições assépticas, perfundiram-se os pulmões através do coração com 20 mL de PBS (Sigma Chemical Co.) estéril. Os pulmões foram, então, removidos e cortados em pequenos pedaços e passaram por duas etapas de digestão enzimática com colagenase tipo 1A (1 mg/mL; Gibco BRL). O digerido resultante foi filtrado através de uma malha de nylon e centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em meio Iscove's (Iscove's Modified Dulbecco's

Media, Sigma Chemical Co.) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (0.1 mg/mL) e plaqueado em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Costar Corporation). As células foram mantidas em cultura de monocamadas até a confluência e tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,125% (Gibco BRL) e EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co.). A população celular foi caracterizada através da expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso através de imunocitoquímica.

### **3.8. Imunocitoquímica para $\alpha$ -actina de músculo liso**

Após a terceira tripsinização, as células foram semeadas em lamínulas de vidro e mantidas em cultura durante 12 h. As células foram fixadas com paraformaldeído/sacarose 4% durante 30 minutos. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% durante 20 minutos. Após a permeabilização, foi feito o bloqueio com BSA 1% diluído em TBS. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -SMA (1:400; Sigma Chemical Co.) a 4°C durante 12 h. Após a lavagem, foi feita a incubação com o anticorpo secundário conjugado a AlexaFlúor 488 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e com o marcador nuclear, TOPRO-3 (1:1000; Invitrogen), durante 1 h. As lâminas foram montadas com DABCO (1,4-diazobociclo[2,2,2]octano; Sigma Chemical Co.) e as análises foram realizadas no microscópio de varredura confocal a laser (Zeiss 510 Meta).

### **3.9. Sistema de cultivo tridimensional de fibroblastos pulmonares**

Placas de 96 poços com fundo U (Falcon) foram revestidas com uma solução de agarose 1% (Seakem LE) preparada com água destilada estéril formando uma fina camada não adesiva sobre a superfície dos poços. Após a terceira passagem,  $1,25 \times 10^4$  células em meio Iscove's suplementado com 2% de soro fetal bovino, na ausência ou presença de diferentes concentrações de rmlL-13, foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 96 h, o sobrenadante foi recolhido e

congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e, os esferóides foram fixados com paraformaldeído/sacarose 4% e armazenados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **3.10. Ensaio de proliferação**

Para análise da taxa de proliferação foram adicionados  $0.5\ \mu\text{Ci}$  de  $[\text{H}^3]$  timidina (Sigma Chemical Co.) por poço aos esferóides já formados (96 h). Após 4 h, os esferóides foram recolhidos e lavados com PBS três vezes, para retirada do excesso de timidina não incorporada. Na seqüência,  $100\ \mu\text{L}$  de Triton X-100 (Amersham Biosciences) e  $900\ \mu\text{L}$  de tripsina foram adicionados com o objetivo de dissociar os esferóides e lisar as células para expor o material nuclear. Após 30 min de incubação, o material que foi transferido para tubos aos quais haviam sido adicionados 3 mL de líquido de cintilação. A radioatividade foi quantificada em um cintilador (Beckman LS6500 Multi-Purpose Scintillation Counter).

### **3.11. Imunofluorescência no esferóide inteiro**

Após 96 h em cultura, os esferóides foram recolhidos e lavados em PBS e, em seguida fixados em uma solução contendo paraformaldeído 4% e sacarose 4% durante 1 h. Após a fixação, os esferóides foram permeabilizados em uma solução tampão Tris (TBS) contendo 0,5% de Triton X-100 durante 30 minutos, lavados em TBS contendo 0,01% de Triton X-100 e incubados com TBS/BSA 1% durante 1 h. Após o bloqueio das ligações inespecíficas, os esferóides foram incubados com anticorpo primário anti-fibronectina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluídos 1:100 a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. Após a lavagem, os esferóides foram incubados com anticorpo secundário conjugado a AlexaFluor 488 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 1 h e ressuspendidos em DABCO (1,4-diazobicyclo[2,2,2]octano; Sigma Chemical Co.). As análises foram realizadas no microscópio de varredura confocal a laser (Zeiss 510 Meta). A expressão de fibronectina foi mensurada com o auxílio do programa Image-Pro-Plus 6.2 em 16

cortes obtidos por microscopia confocal a partir da superfície de cada esferóide com intervalos de 1  $\mu\text{m}$  entre cada secção.

### **3.12. Análise estatística**

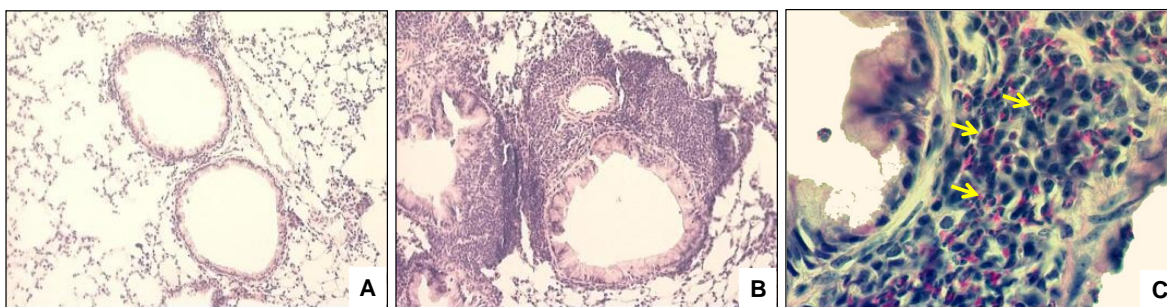
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças das variáveis entre os grupos foram testadas pela análise de variância One-way ANOVA, seguida de teste de comparação múltipla de Newman-Keuls-Student. Para comparação entre dois grupos experimentais, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras não pareadas. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. Resultados

### 4.1. Análise da estrutura e da composição tecidual pulmonar no modelo murino de asma crônica

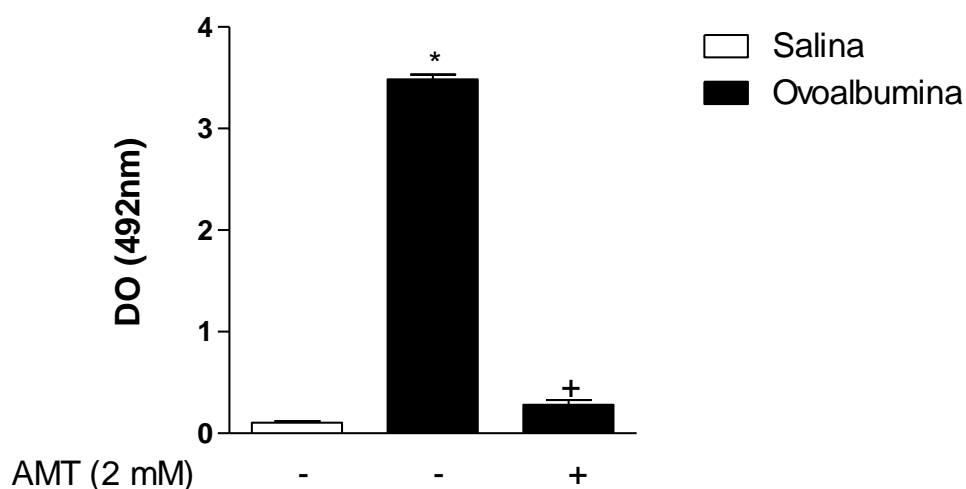
Neste estudo, estabelecemos um modelo experimental murino de asma crônica em resposta ao desafio antigênico com ovoalbumina, que seguiu o protocolo indicado na Figura 3.1. Este modelo reproduziu diversas características do remodelamento das vias aéreas relacionados à patogênia da asma crônica (McMillan & Lloyd, 2004).

Através da análise histopatológica pela coloração com hematoxilina-eosina (H&E), verificamos que os animais ativamente sensibilizados e desafiados apenas com salina apresentaram integridade da estrutura pulmonar (Figura 4.1 A), enquanto que os pulmões de animais ativamente sensibilizados e desafiados com ovoalbumina apresentaram um intenso infiltrado celular (Figura 4.1 B) composto predominantemente por eosinófilos (36,5%) (Figura 4.1 C).



**Figura 4.1.** Análise histopatológica das alterações no tecido pulmonar após a exposição crônica a ovoalbumina. Foram obtidos cortes histológicos de pulmão (4  $\mu$ m), corados com H&E e avaliados em microscópio de luz. O grupo de animais controle está apresentado no painel A e os animais ativamente sensibilizados e desafiados com ovoalbumina estão representados no painel B (aumento 40 X). Imagem em maior aumento (100 X) de cortes histológicos de pulmão de camundongos ativamente sensibilizados e desafiados (painel C).

O aumento do número de eosinófilos nessa condição foi confirmado através da quantificação de peroxidase de eosinófilos no tecido pulmonar, onde esta enzima mostrou-se significativamente aumentada nos animais que foram expostos à ovoalbumina (Figura 4.2). O bloqueio do sinal observado em condições de co-incubação com AMT, um inibidor específico da peroxidase de eosinófilos, garantiu a especificidade da resposta obtida.



**Figura 4.2.** Quantificação de peroxidase de eosinófilos após exposição crônica a ovoalbumina. A quantificação de peroxidase de eosinófilos foi realizada utilizando-se um substrato contendo OPD e peróxido de hidrogênio. Após 30 minutos a reação foi interrompida com a adição de  $H_2SO_4$ . A leitura de densidade ótica (DO) foi realizada por quantificação espectrofotométrica a 492 nm. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de no mínimo 6 animais. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo salina. † $p < 0.05$  em relação ao grupo ovoalbumina.

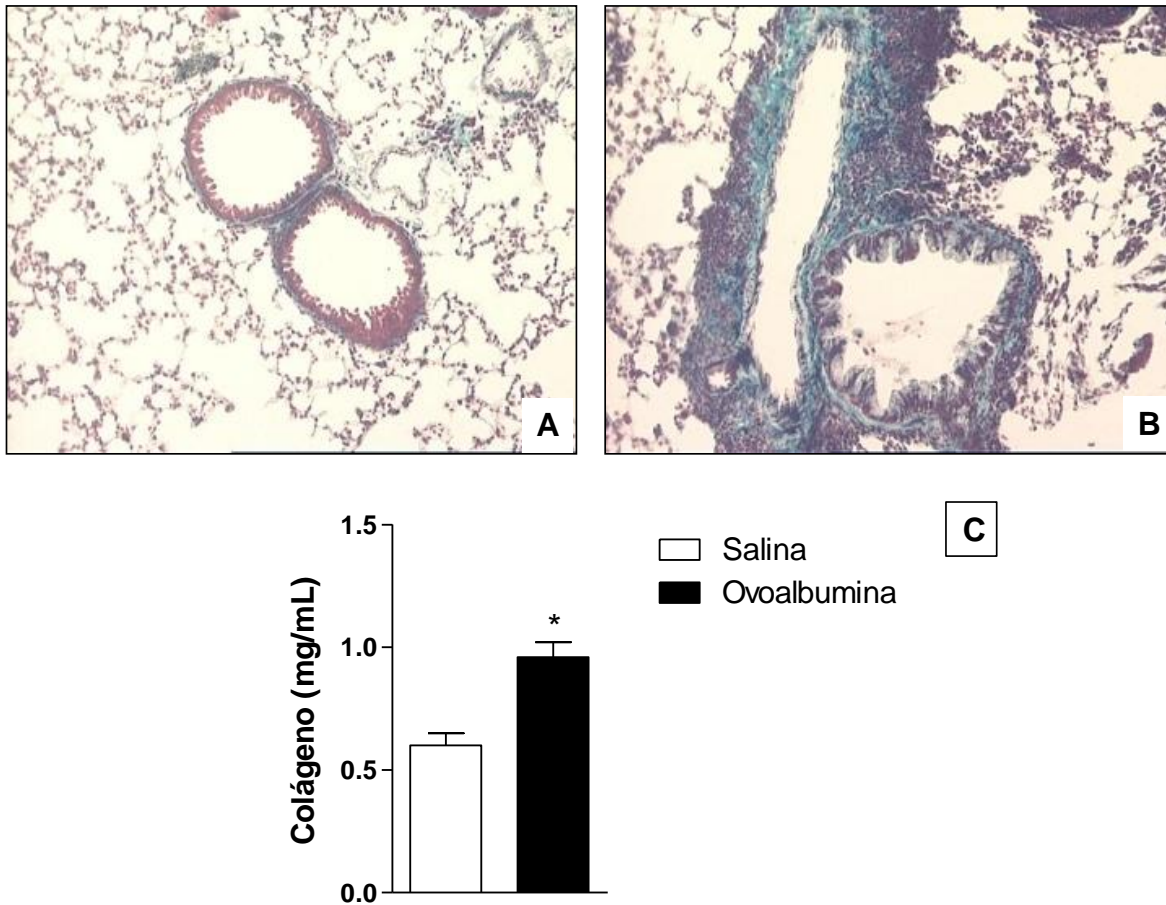
Em seguida, avaliamos o depósito de matriz extracelular, que é sabidamente uma importante característica do processo de remodelamento das vias aéreas. Mediante o uso da coloração por tricrômico de Gomori, notamos que os pulmões de animais controle apresentaram uma deposição basal de proteínas de matriz

extracelular (Figura 4.3 A), enquanto nos pulmões de camundongos desafiados com ovoalbumina observamos sinais de remodelamento tecidual, como acúmulo de componentes de matriz extracelular nas regiões subepitelial, peribrônquica e perivascular (Figura 4.3 B). Em paralelo, foi detectado um aumento na produção de colágeno em amostras de tecido pulmonar obtidas dos animais que foram instilados com ovoalbumina (Figura 4.3 C), ratificando o aumento significativo desse componente de matriz extracelular no contexto estudado.

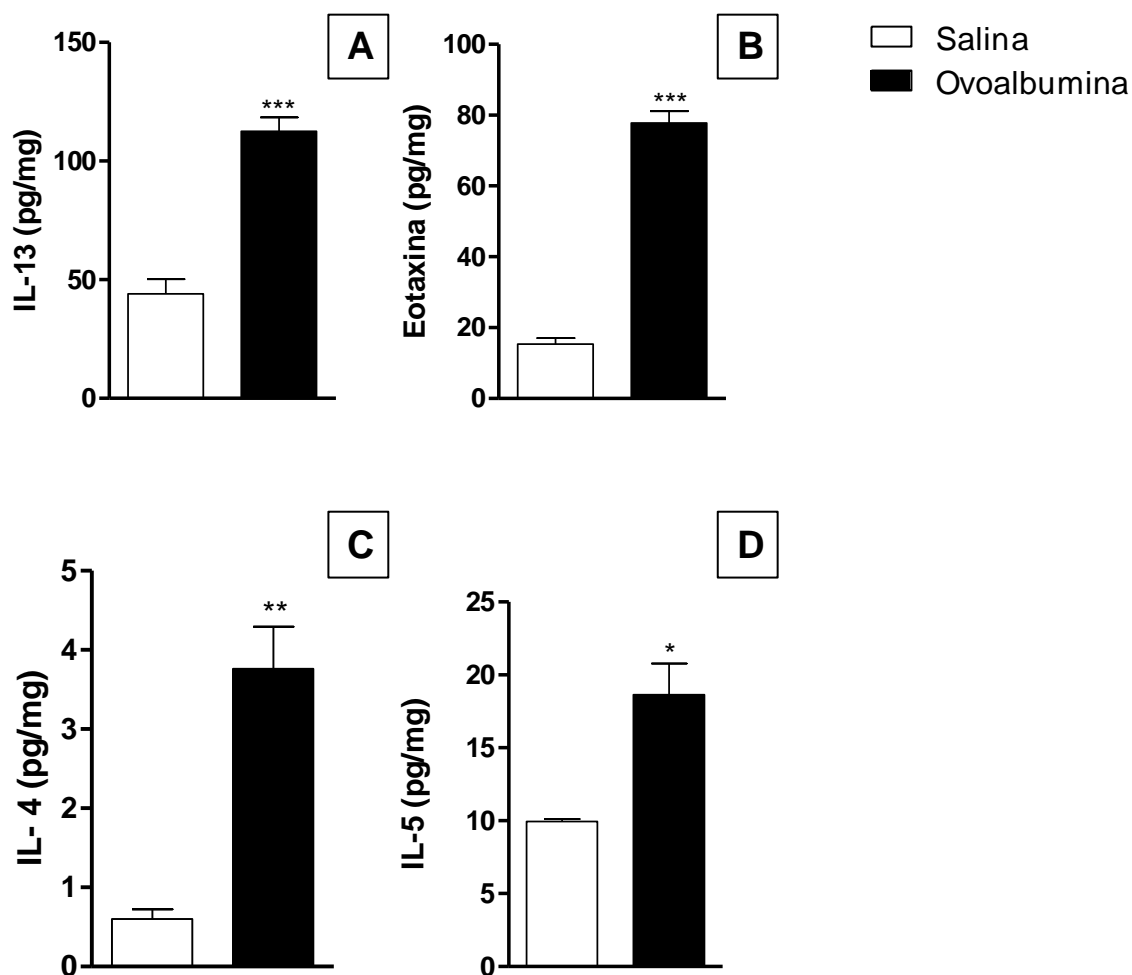
#### **4.2. Avaliação da produção de citocinas no modelo murino de asma crônica**

O remodelamento das vias aéreas é finamente regulado por um complexo de citocinas e quimiocinas (Broide, 2008). Baseado nisso, avaliamos a produção de IL-13, eotaxina-1, IL-4 e IL-5, que são as principais citocinas associadas à asma, através de ELISA. Observamos, assim, um expressivo aumento desses mediadores no tecido pulmonar em animais que foram expostos à ovoalbumina quando comparado ao grupo desafiado com salina (Figura 4.4).





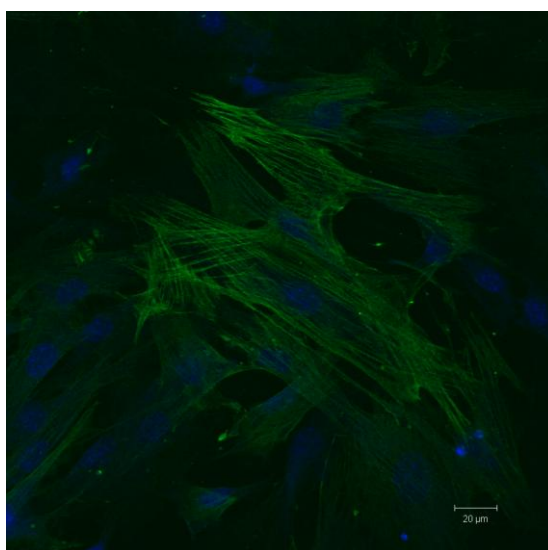
**Figura 4.3.** Análise histopatológica da deposição de proteínas de matriz extracelular e quantificação de colágeno no tecido pulmonar. Foram obtidos cortes histológicos de pulmão (4  $\mu$ m), corados com tricrômico de Gomori e avaliados em microscópio de luz (aumento 100 X). O grupo de animais controle está apresentado no painel A e os animais ativamente sensibilizados e desafiados com ovoalbumina estão representados no painel B. A produção de colágeno (Painel C) foi quantificada no homogenato de tecido pulmonar utilizando-se o método de Sircol. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo salina.



**Figura 4.4.** Análise da produção de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de camundongos desafiados antígenoicamente. A produção das citocinas foi detectada através do ensaio de ELISA. Os dados representam média  $\pm$  EPM de no mínimo 6 animais em cada grupo. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados ao grupo salina.

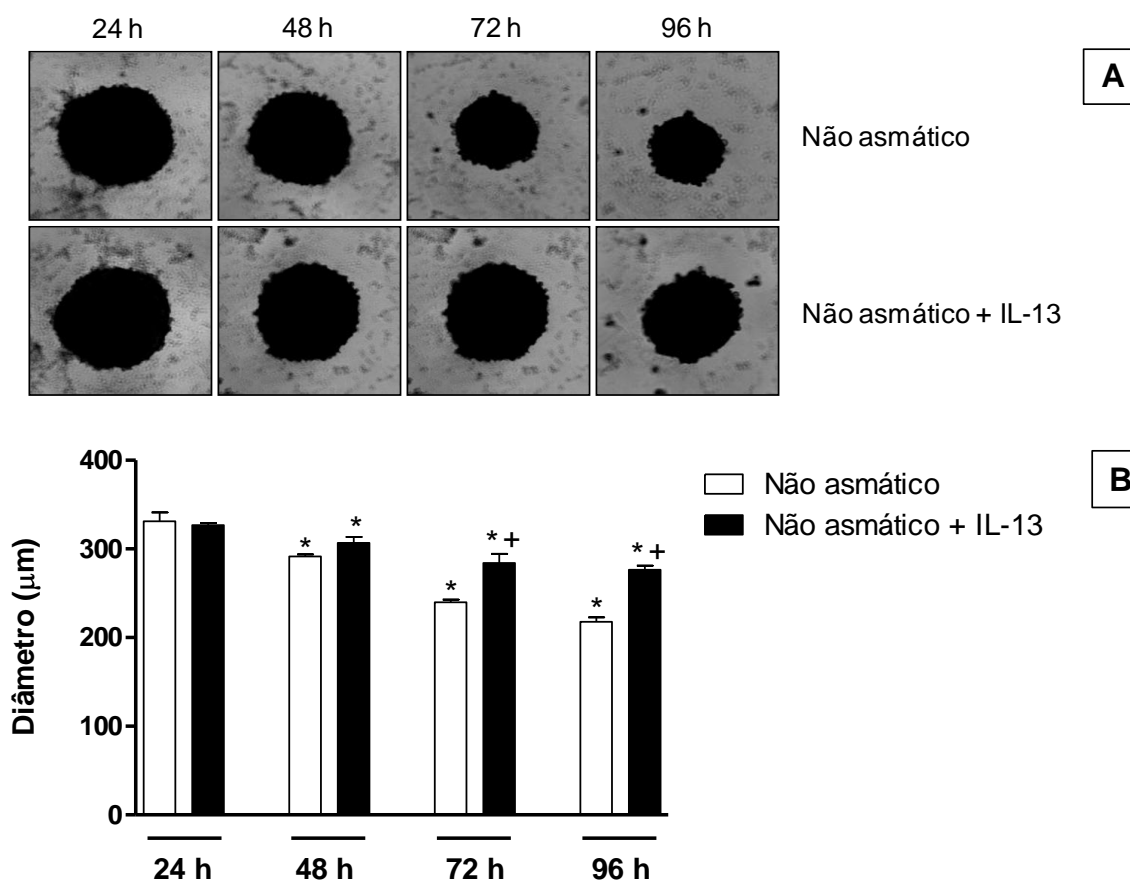
### 4.3. Caracterização do sistema de cultura tridimensional de fibroblastos provenientes de animais sadios

Visto que foi possível estabelecer um modelo de asma crônica e sabendo-se que o processo de gênese da fibrose é pouco entendido, consideramos que o cultivo tridimensional de fibroblastos pulmonares poderia ser uma ferramenta importante para se entender melhor a formação/organização do processo fibrótico na asma. Dessa forma, estabelecemos inicialmente um protocolo de cultura primária em monocamada de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos Balb/c adultos normais, sendo a população celular caracterizada, após a terceira tripsinização, pela expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Avaliação da expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) em fibroblastos pulmonares de camundongos sadios. Após a terceira passagem, as células foram cultivadas em monocamadas. Posteriormente, as células foram semeadas em lamínulas de vidro, fixadas e permeabilizadas. Após a etapa de bloqueio com BSA, as células foram incubadas durante 12 h com anticorpo primário anti- $\alpha$ -SMA. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário durante 1 h. Os núcleos foram marcados com TOPRO-3. As imagens foram obtidas através de microscopia confocal (aumento 40 X).

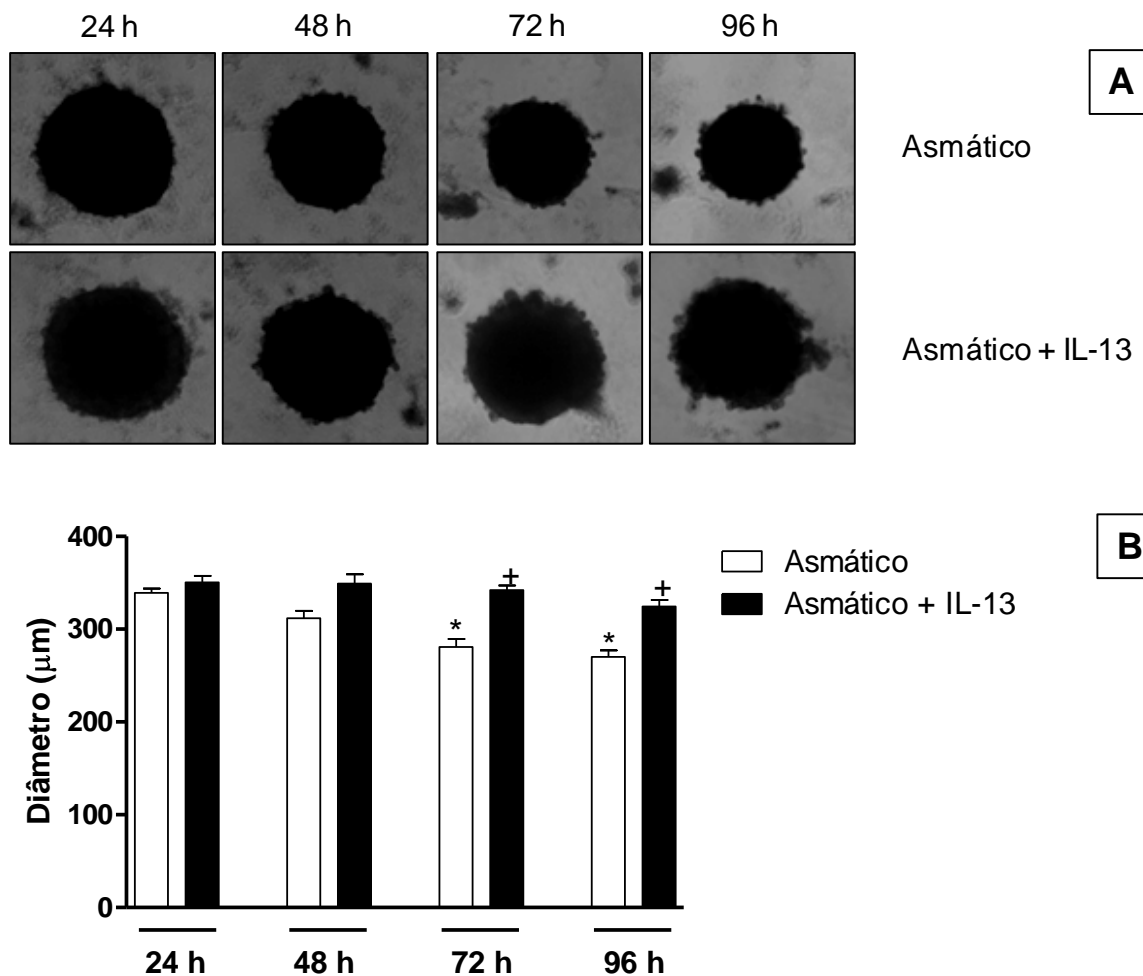
Em seguida, o cultivo de fibroblastos em microambiente tridimensional foi obtido prevenindo-se a adesão dessas células à superfície da placa através do revestimento dos poços com agarose 1%. Como ilustrado na figura 4.6 A, observou-se que fibroblastos provenientes de animais saudáveis foram capazes de reorganizarem-se em esferóides já nas primeiras 24 h em cultivo. O acompanhamento desses esferóides por 96 h em cultura revelou uma progressiva redução no volume dessas estruturas ao longo do tempo, fenômeno este inibido significativamente pelo cultivo dos esferóides na presença de IL-13 (Figura 4.6 A). Reforçando essa observação, dados quantitativos relativos aos diâmetros dos esferóides cultivados por 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, na presença ou ausência de IL-13, são mostrados na figura 4.6 B.



**Figura 4.6.** Avaliação morfológica de esferóides formados por fibroblastos pulmonares provenientes de animais sadios. (A) Imagens representativas de esferóides de fibroblastos pulmonares provenientes de animais sadios na ausência ou presença de 40 ng/mL de IL-13 nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, obtidas através de microscopia de contraste de fase (aumento 40 X). (B) O diâmetro dos esferóides foi mensurado com auxílio do programa Image-Pro-Plus 6.2. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de no mínimo 4 esferóides. \* $p < 0.05$  comparado ao respectivo grupo no tempo de 24 h. + $p < 0.05$  comparado ao grupo não estimulado com IL-13, no respectivo tempo.

#### **4.4. Caracterização do sistema de cultura tridimensional de fibroblastos provenientes de animais “asmáticos”**

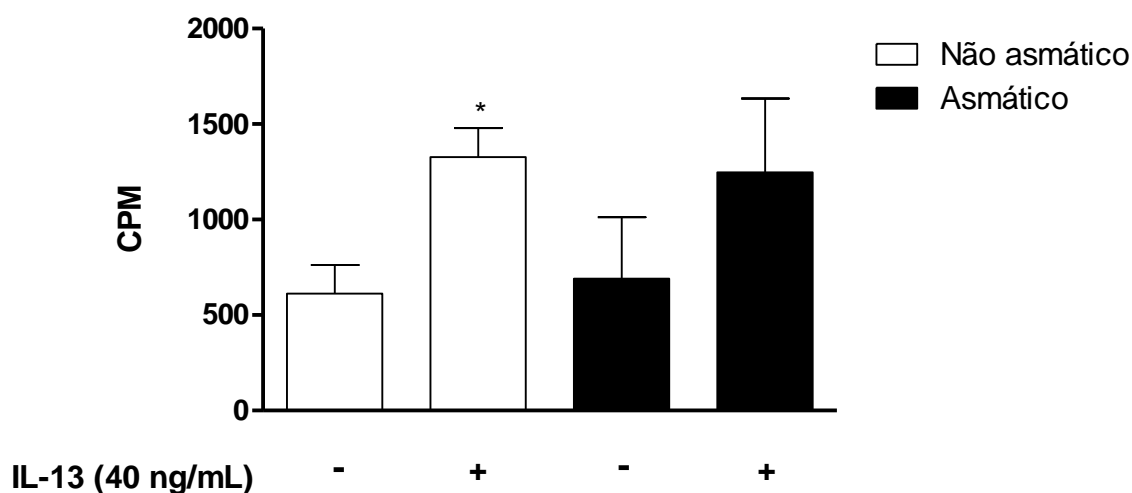
Os resultados anteriores mostraram que os fibroblastos provenientes de camundongos saudáveis são capazes de formar esferóides. A partir dessa observação, examinamos a formação e o desenvolvimento de esferóides em populações de fibroblastos oriundos de pulmões de camundongos ativamente sensibilizados e desafiados com ovoalbumina. Desse modo, verificamos que esferóides de fibroblastos pulmonares de camundongos “asmáticos” apresentaram também redução de tamanho ao longo das 96 h de cultivo (Figura 4.7 A), mas de maneira mais atenuada do que aquela apresentada por esferóides formados com fibroblastos pulmonares de animais normais. Conforme observado anteriormente para esferóides formados por fibroblastos de pulmões saudáveis, a adição de IL-13 ao sistema de esferóides formados por células do pulmão asmático também preveniu a diminuição de tamanho dessas estruturas (Figura 4.7 A). Reforçando essa constatação, dados quantitativos relativos aos diâmetros dos esferóides cultivados por 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, na presença ou ausência de IL-13, são mostrados na figura 4.7 B. Tomados em conjunto, estes resultados indicam que esferóides formados por células de animais saudáveis e cultivados na presença de IL-13 assemelham-se morfológicamente a esferóides de células procedentes de animais asmáticos após 96 h de cultura.



**Figura 4.7.** Avaliação das alterações de forma e diâmetro de esferóides formados por fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos “asmáticos”. Imagens representativas de esferóides formados por fibroblastos pulmonares provenientes de animais ativamente sensibilizados e desafiados com ovoalbumina na ausência ou presença de 40 ng/mL de IL-13 nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h e 96 h obtidas através de microscopia de contraste de fase (aumento 40 X) (A). O diâmetro dos esferóides foi mensurado através do programa Image-Pro-Plus 6.2 (B). Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de no mínimo 4 esferóides. \* $p < 0.05$  comparado ao respectivo grupo no tempo de 24 h. <sup>+</sup> $p < 0.05$  comparado ao grupo não estimulado com IL-13, no respectivo tempo.

#### 4.5. Avaliação da proliferação celular em esferóides de fibroblastos provenientes de animais sadios e “asmáticos”

Avaliamos a capacidade proliferativa das células componentes dos esferóides através da incorporação de timidina tritiada por um período de 4 h decorridas 96 h de cultivo. Verificou-se que a exposição à IL-13, por 96 h, não modificou significativamente o padrão de proliferação de fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos “asmáticos”, ao contrário do observado com fibroblastos provenientes de pulmões sadios (Figura 4.8) .



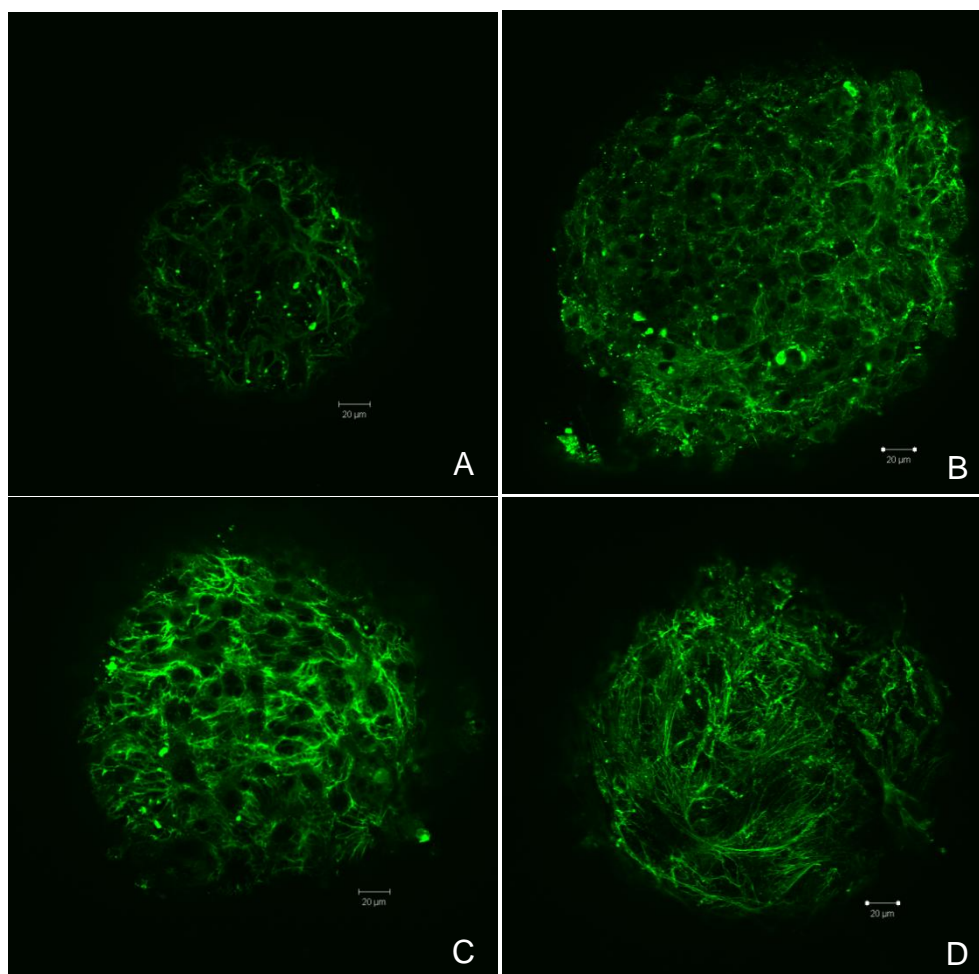
**Figura 4.8.** Avaliação da proliferação celular em esferóides de fibroblastos provenientes de animais sadios e “asmáticos”. A proliferação celular foi mensurada através da incorporação de timidina tritiada (0.5  $\mu$ Ci), 96 h após o plaqueamento das células. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 1 experimento, realizado com um conjunto de 6 esferóides por amostra (n=5). \*p<0.05 comparado ao grupo não asmático na ausência de IL-13.



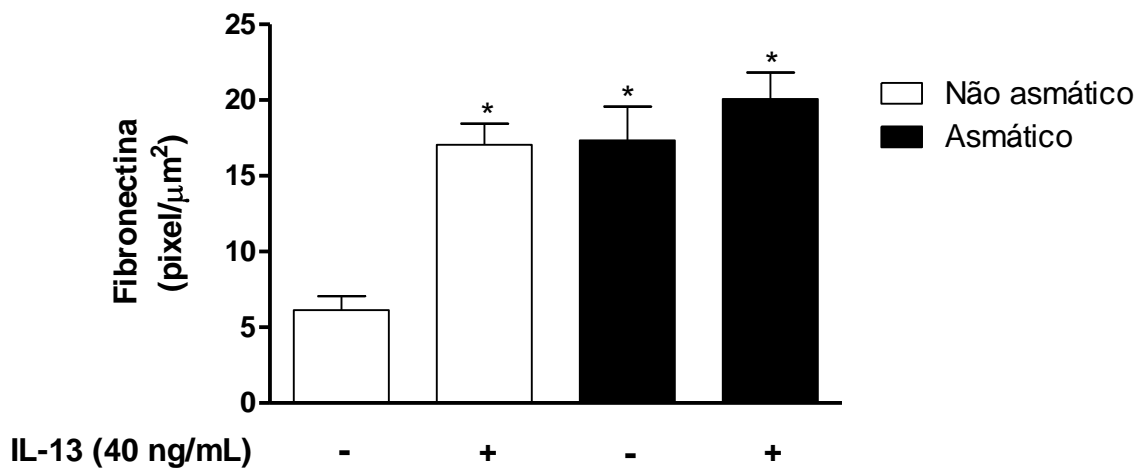
#### **4.6. Expressão de fibronectina em esferóides de fibroblastos provenientes de animais não asmáticos e “asmáticos”**

A figura 4.9 A mostra a expressão de fibronectina no esferóide formado com células provenientes de pulmões de animais não asmáticos (condição controle), oriundas de um tecido pulmonar hígido, enquanto que a figura 4.9 B revela a expressão de fibronectina por um esferóide formado com células provenientes de pulmões de animais “asmáticos”, que apresentavam marcado remodelamento pulmonar (condição remodelada). Após 96 h de cultivo, além do evidente maior tamanho, constatou-se, também um marcado aumento de expressão de fibronectina naquele esferóide formado com fibroblastos provenientes de tecido remodelado. Cultivado na presença de IL-13 (40 ng/ml), o esferóide da condição controle apresentou tamanho e padrão de expressão de fibronectina comparável aquele da condição remodelada (Figura 4.9 C), enquanto que o esferóide da condição remodelada (Figura 4.9 D) mostrou o mesmo padrão de resposta observado na ausência da citocina.

A figura 4.10 reforça essa interpretação com dados quantitativos. Observou-se um aumento significativo na expressão de fibronectina, em planos obtidos entre 3 a 8  $\mu\text{m}$  da superfície do esferóide, quando esferóides da condição remodelada foram comparados aos esferóides da condição controle. O co-cultivo em presença de IL-13 de fato aumentou a expressão de fibronectina dos esferóides da condição controle sem interferir com o padrão de expressão dos esferóides da condição remodelada.



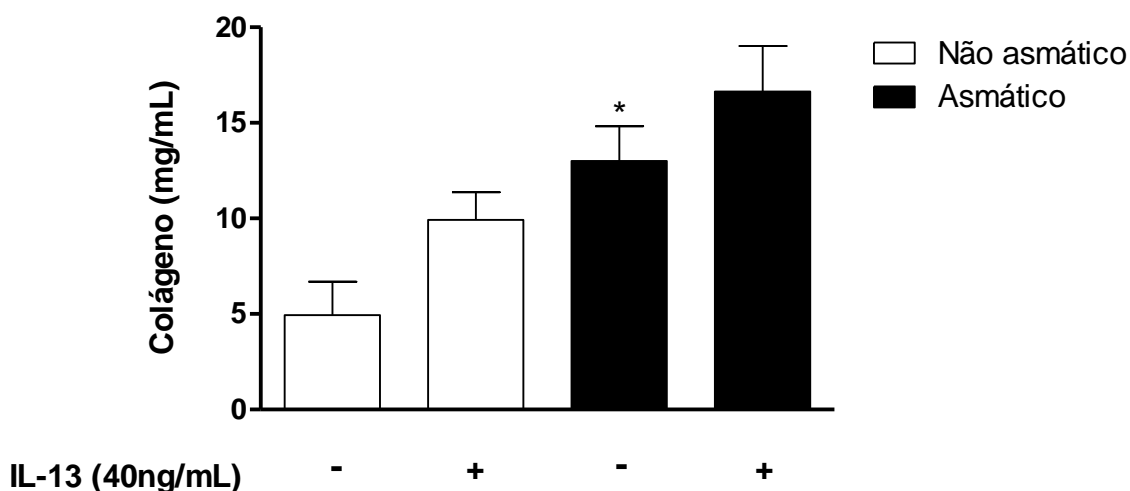
**Figura 4.9.** Expressão de fibronectina em esferóides de fibroblastos provenientes de animais saudáveis e “asmáticos”. Os esferóides foram cultivados durante 96 h, fixados em paraformaldeído 4% e processados para imunomarcação. Os esferóides foram analisados ao microscópio de varredura confocal a laser através de 16 cortes com intervalos de 1  $\mu\text{m}$  ao longo da estrutura do esferóide. A marcação para fibronectina em esferóides compostos por fibroblastos de pulmões de animais saudáveis está representada nos painéis A (ausência de IL-13) e C (presença de 40 ng/mL de IL-13), e no caso de esferóides compostos por fibroblastos de pulmões de camundongos asmáticos está representada nos painéis B (ausência de IL-13) e D (presença de 40 ng/mL de IL-13). Barra = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.10.** Quantificação da expressão de fibronectina em esferóides compostos por fibroblastos oriundos de animais saudáveis e “asmáticos”. A expressão de fibronectina foi mensurada com o auxílio do programa Image-Pro-Plus 6.2 em 16 cortes obtidos por microscopia confocal a partir da superfície de cada esferóide com intervalos de 1 μm entre cada seção. O gráfico representa a média da quantificação de expressão de fibronectina entre as seções de 3 a 8 μm de profundidade. Os dados são representados como média ± EPM de 3 esferóides. \*p<0.001 comparado ao grupo não asmático na ausência de IL-13.

#### 4.7. Avaliação da produção de colágeno por esferóides de fibroblastos pulmonares obtidos de camundongos provocados ou não com alérgeno

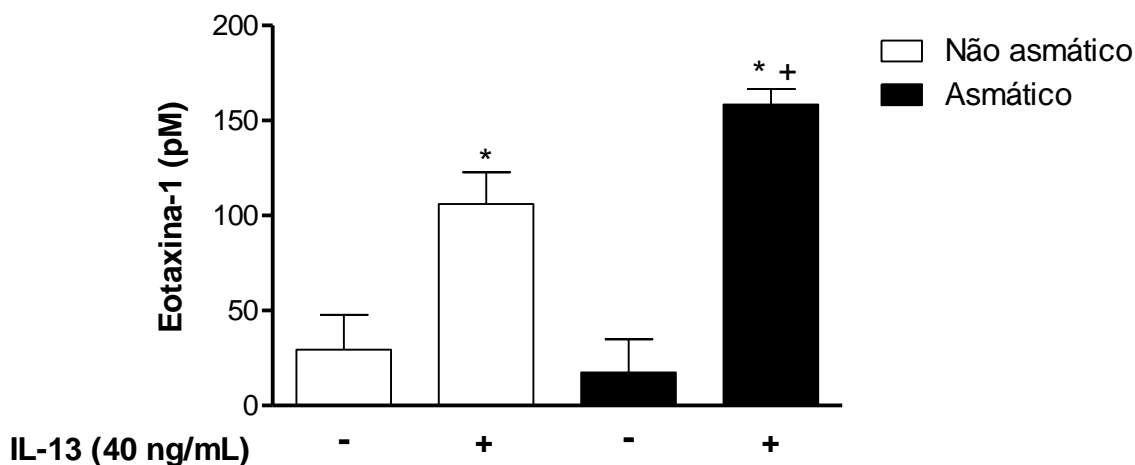
A figura 4.11 mostra um aumento significativo no conteúdo de colágeno quantificado bioquimicamente (método de Sircol) no sobrenadante de esferóides da condição remodelada, comparado ao sobrenadante de esferóides da condição controle. Neste caso, entretanto, apesar da tendência, a IL-13 não aumentou significativamente a produção de colágeno dos esferóides da condição controle nem da remodelada.



**Figura 4.11.** Análise quantitativa da produção de colágeno por esferóides compostos por fibroblastos provenientes de pulmões de camundongos não asmáticos e “asmáticos”, na ausência ou presença de IL-13 (40 ng/ml). A produção de colágeno foi mensurada, através do método de Sircol, no sobrenadante da cultura de esferóides 96 h após o plaqueamento das células. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de pelo menos 6 esferóides. \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo não asmático em ausência de IL-13.

#### 4.8. Avaliação da produção de eotaxina-1 em esferóides formados por fibroblastos provenientes de camundongos não asmáticos e “asmáticos”

Os fibroblastos podem contribuir para a regulação da inflamação através da liberação de citocinas e quimiocinas (Zhang, 1996). Neste estudo, observamos que, após 96 h de cultura, detectou-se uma produção basal baixa de eotaxina-1 por esferóides da condição controle, que não foi diferente daquela gerada por esferóides da condição remodelada (Figura 4.12). Por outro lado, notamos que o co-cultivo desses esferóides com IL-13 levou a um acentuado aumento de geração da quimiocina por esferóides das duas condições, numa proporção que foi significativamente maior naqueles esferóides da condição remodelada.

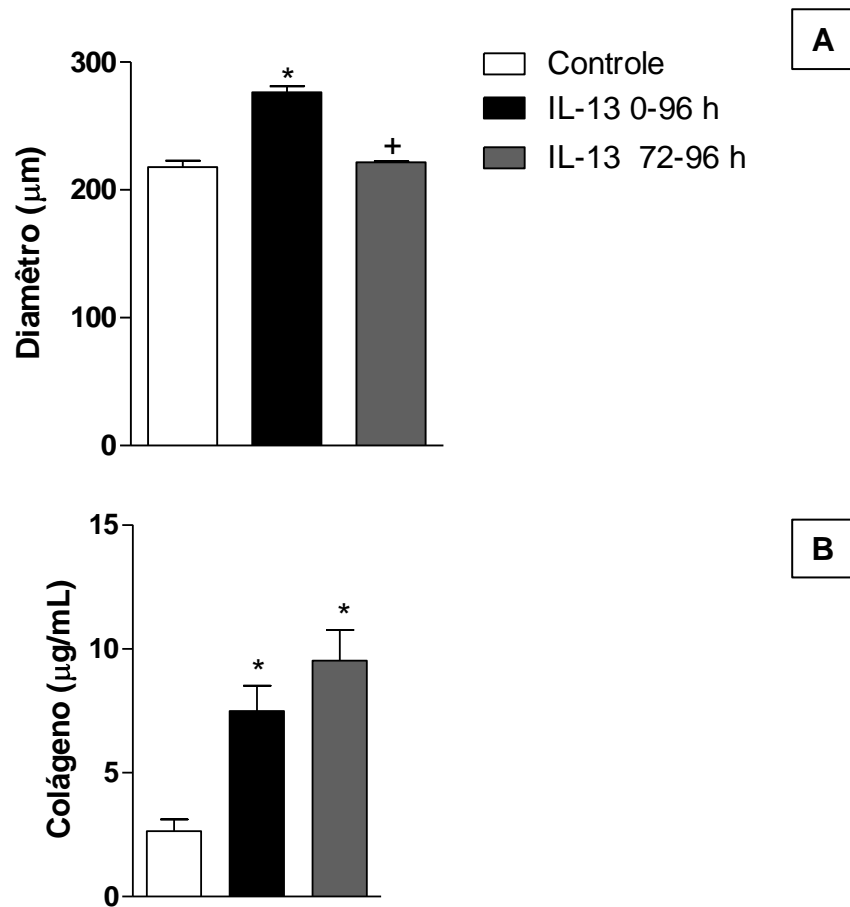


**Figura 4.12.** Avaliação da produção de eotaxina-1 liberada no sobrenadante de esferóides compostos por fibroblastos procedentes de camundongos saudáveis e/ou “asmáticos”. A produção de eotaxina-1 foi mensurada no sobrenadante da cultura de esferóides 96 h após o plaqueamento das células através do método de ELISA. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 4 esferóides. \* $p < 0.05$  comparado ao respectivo grupo controle. + $p < 0.05$  comparado ao grupo não asmático na presença de IL-13.

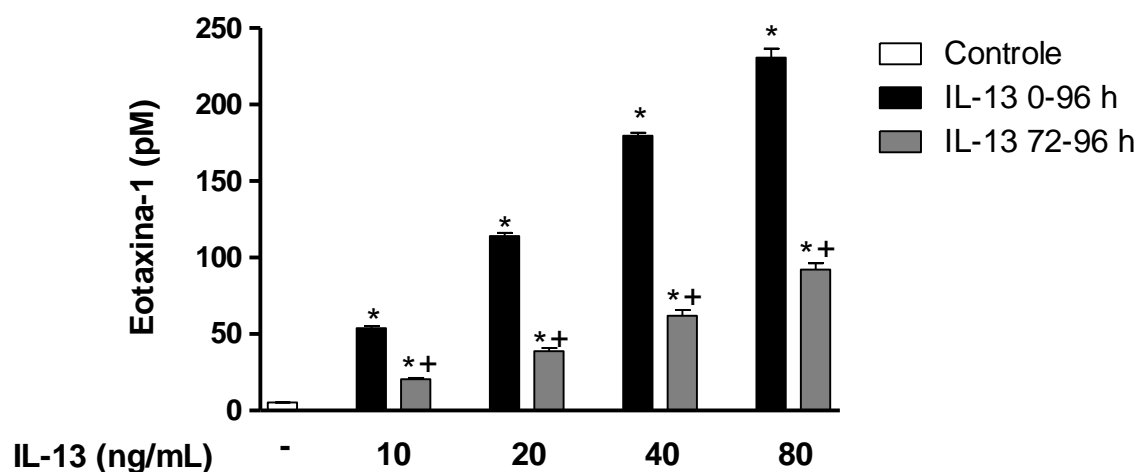
#### 4.9. Estado funcional de esferóides após 72 h em cultivo

Há na literatura evidências de que fibroblastos, e outras células estruturais, entram rapidamente em apoptose quando cultivadas em esferóides (Bizik e cols., 2004). Em nosso modelo, observamos no tempo de 96 h sob estimulação com IL-13 alguns parâmetros de atividade celular como proliferação, produção de citocinas e de proteínas de MEC. Para avaliar o estado funcional de fibroblastos em esferóides, analisamos a responsividade dessas células a IL-13 após 72 h de cultivo. Utilizando esferóides formados com fibroblastos pulmonares obtidos de tecido hígido, demonstramos que a adição de IL-13 (40 ng/ml) 72 h após o início da cultura não foi capaz de modificar o diâmetro do esferóide observado no tempo de 96 h em cultura, portanto 24 h depois da estimulação com a citocina (Figura 4.13 A), ao contrário do observado quando do co-cultivo com IL-13 por 96 h. Entretanto, nessas mesmas condições, a estimulação com IL-13, 72 h após o início da cultura, aumentou significativamente o teor de colágeno secretado pelo esferóide, 24 h depois, em magnitude de aumento comparável àquele notado na condição de co-cultivo com IL-13 por 96 h (Figura 4.13 B).

Resultados semelhantes aos do colágeno foram obtidos quando se avaliou o teor secretado de eotaxina-1, seguindo o mesmo protocolo. Observamos que a IL-13 (10-80 ng/ml), adicionada na cultura 72 h após seu início, induziu um aumento de produção de eotaxina-1, do tipo concentração-resposta, que foi proporcional aquele observado quando do co-cultivo do esferóide com a citocina por 96 h (Figura 4.14). Esses dados em conjunto demonstram que após 72 h em cultivo, as células em esferóides mantêm-se capazes de responder a estimulação com IL-13.



**Figura 4.13.** Avaliação do estado funcional de esferóides após 72 h em cultivo. Fibroblastos provenientes de tecido pulmonar hígido foram plaqueados na ausência (controle) ou presença de 40 ng/mL de IL-13, adicionada concomitantemente ao plaqueamento (0-96 h) ou 72 h após o início da cultura (72-96 h). O diâmetro dos esferóides foi mensurado através do programa Image-Pro-Plus 6.2. 96 h após o plaqueamento das células (A). A produção de colágeno foi mensurada no sobrenadante da cultura de esferóides através do método de Sircol (B). Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de no mínimo 6 esferóides. \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. <sup>+</sup> $p < 0.05$  quando comparado ao grupo IL-13 0-96 h.



**Figura 4.14.** Avaliação do estado funcional de esferóides após 72 h em cultivo. Fibroblastos provenientes de tecido pulmonar hígido foram plaqueados na ausência (controle) ou presença de 40 ng/mL de IL-13, adicionada concomitantemente ao plaqueamento (0-96 h) ou 72 h após o início da cultura (72-96 h). A produção de eotaxina-1 foi mensurada no sobrenadante da cultura de esferóides 96 h após o plaqueamento das células através do método de ELISA. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 4 esferóides. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle. + $p < 0.05$  em relação ao grupo IL-13 0-96 h.



## 5. Discussão

A neogênese da fibrose pulmonar e seu impacto na patogenia da asma são fenômenos ainda pouco compreendidos, em grande parte devido à falta de sistemas que reproduzam o processo em condições experimentais controladas. Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de modelos *in vivo*, e também *in vitro*, que permitam o estudo da fibrose pulmonar e possíveis formas de prevenção e intervenção farmacológica. Neste estudo, concentramos esforços no estabelecimento de um sistema de cultura 3D baseado em esferóides formados por fibroblastos isolados de pulmão murino. A ideia central foi desenvolver um modelo experimental que possibilitasse o estudo dos mecanismos de fibrogênese *in vitro*, e auxiliasse nas estratégias de triagem de candidatos a fármacos antiasmáticos inovadores. Nossa estratégia foi comparar fenótipos de esferóides de fibroblastos pulmonares, provenientes de camundongos doadores saudáveis, com aqueles provenientes de camundongos sensibilizados e desafiados por instilação nasal de ovoalbumina. Inicialmente, padronizamos um modelo animal de asma em camundongos BALB/c, cepa muito frequentemente utilizada em modelos experimentais de asma aguda.

Os modelos experimentais de asma murinos são importantes ferramentas para investigar mecanismos subjacentes à inflamação alérgica aguda e desenvolvimento de hiperreatividade brônquica, duas importantes características da asma humana (Wegmann, 2008). Em geral, esses modelos baseiam-se em uma sensibilização sistêmica com proteínas antigênicas, como a ovoalbumina, adsorvidas a um adjuvante (hidróxido de alumínio). Uma vez sensibilizados, estes animais desenvolvem eosinofilia e hiperreatividade brônquica após a inalação ou instilação intranasal com ovoalbumina (Kumar & Foster, 2002; Kips e cols., 2003; Wegmann, 2008). Esses modelos são limitados, principalmente, por não reproduzirem as alterações histopatológicas associada à asma crônica. A principal estratégia utilizada para induzir um processo de asma crônica é o aumento no número de repetições dos desafios antigênicos com ovoalbumina (Lloyd & Robinson, 2007). Entretanto, essa estratégia apresenta, frequentemente,

problemas associados à tolerância imunológica, condição caracterizada pela diminuição progressiva da eosinofilia, da hiperreatividade das vias aéreas e das mudanças estruturais (Yiamouyiannis e cols., 1999; Lloyd e cols., 2001, Shinagawa & Kojima, 2003).

Em um estudo anterior, Shinagawa & Kojima (2003) compararam a evolução do processo inflamatório e do remodelamento das vias aéreas utilizando um modelo de exposição crônica à ovoalbumina em quatro diferentes cepas de camundongos (A/J, BALB/c, C57BL/6, e C3H/HeJ). Nesse modelo, os camundongos foram desafiados através de instilação intranasal com ovoalbumina três vezes por semana, durante 12 semanas consecutivas, sem sensibilização sistêmica prévia. Inicialmente, foi observado que a magnitude do processo inflamatório e das mudanças estruturais é dependente das cepas de camundongos. Camundongos A/J apresentaram inflamação eosinofílica contínua, alterações histológicas típicas do remodelamento das vias aéreas (espessamento da parede das vias aéreas e aumento da deposição de colágeno) e hiperreatividade brônquica persistente. Enquanto, camundongos BALB/c apresentaram esse mesmo quadro, porém, em menor intensidade, demonstrando assim que essa cepa apresenta um determinado grau de tolerância à exposição antigênica crônica. Baseados em estudos prévios, trabalhamos com camundongos Balb/C sensibilizados com uma mistura de ovoalbumina e hidróxido de alumínio nos dias 0 e 14. O desafio antigênico foi feito por via intranasal, administrando-se ovoalbumina três vezes por semana durante duas semanas consecutivas, decorridos 30 dias do início da sensibilização (McMillan SJ & Lloyd CM, 2004). Nessas condições observamos intenso infiltrado inflamatório, predominantemente eosinofílico, espessamento da parede das vias aéreas e o aumento da deposição de componentes da MEC, associado à produção aumentada de IL-13, IL-4, IL-5 e eotaxina-1 no tecido pulmonar. Este modelo de sensibilização e desafio foi subsequente utilizado para a obtenção de pulmões “asmáticos”.

A cultura tridimensional de fibroblastos foi obtida prevenindo-se a adesão dessas células ao substrato através do revestimento da superfície da placa com agarose, que representa uma matriz amorfa e não aderente. A manutenção de

fibroblastos nessas condições favorece interações homotípicas célula-célula levando a formação de reagregados celulares, os quais são denominados esferóides (Bizik e cols., 2004). Primeiramente, observamos que populações homogêneas de fibroblastos pulmonares provenientes de animais saudáveis ou “asmáticos” foram capazes de reagregarem-se em esferóides. Entretanto, observamos que populações celulares heterogêneas (em primeira passagem) de pulmões de camundongos saudáveis ou “asmáticos” não formaram esferóides (dados não mostrados).

Verificamos que esferóides compostos por fibroblastos oriundos da condição remodelada, em condições basais, apresentaram maior deposição de fibronectina e produção de colágeno aumentada quando comparado a esferóides da condição controle. Além disso, esferóides compostos por fibroblastos de animais “asmáticos” também apresentaram maior tamanho no tempo de 96 h. Esse dado demonstra que fibroblastos da condição remodelada conservam *in vitro* características compatíveis com o remodelamento das vias aéreas observado no modelo experimental de asma crônica. Os fibroblastos provenientes de vias aéreas asmáticas, caracterizada pela inflamação persistente e elevados níveis de citocinas, parecem sofrer alterações fenotípicas como um produto do seu ambiente, acarretando em um comportamento diferenciado daquele observado em fibroblastos controle. Entretanto, é surpreendente que tais alterações fenotípicas persistam, uma vez, que as células tenham sido removidas do ambiente inflamatório e cultivadas *in vitro*. Essas alterações primárias no comportamento de células mesenquimais pode ser um mecanismo alternativo que leva a mudanças estruturais observadas na asma. Os resultados obtidos estão em consonância com diversos estudos que apontam o aparecimento de alterações funcionais em células epiteliais (Hastie e cols., 2002), células musculares lisas (Johnson, 2004), e em fibroblastos (Ludwig e cols., 2004; Plante e cols., 2006) de indivíduos com asma, cultivados *in vitro*. Estas diferenças funcionais persistem durante o cultivo *in vitro*, sugerindo que essas alterações são independentes, ou tornam-se independentes, de citocinas inflamatórias. Esse fenômeno também foi observado por Sugiura e colaboradores (2007) que avaliaram *in vitro* fibroblastos obtidos de

camundongos controle e de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina. Comparados com fibroblastos controle, células de animais “asmáticos” apresentaram aumento na quimiotaxia induzida por fibronectina, maior contração em géis tridimensionais de colágeno, maior produção de TGF- $\beta$ , fibronectina, VEGF e  $\alpha$ -SMA. Dentro deste contexto foi também demonstrado que fibroblastos cultivados a partir de biópsias de pulmão de indivíduos com asma grave apresentaram uma expressão acentuada do receptor de PDGF do tipo beta (PDGFR- $\beta$ ) e produção aumentada de pró-colágeno tipo I em resposta a estimulação com PDGF BB em relação a fibroblastos de indivíduos saudáveis (Lewis e cols., 2005).

Estudos em modelos animais de asma fornecem evidências convincentes de que a IL-13, independente de outras citocinas do tipo Th2, é suficiente para induzir todas as características da asma alérgica (Wills-Karp, 2004). A fibrose subepitelial, característica do remodelamento tecidual observado na asma, é mediado por um complexo de citocinas, destacando-se a IL-13. Assim, foi demonstrado que o aumento da expressão de IL-13 nos pulmões de camundongos induz uma intensa resposta fibrótica na parede das vias aéreas (Zhu e cols., 1999). Além da asma, a IL-13 tem sido associada à fibrose em diversas doenças, incluindo a doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose pulmonar idiopática, entre outras (Wills-Karp, 2004). Baseado nessas evidências e na observação de que esta citocina encontra-se aumentada nos pulmões de camundongos submetidos a desafios antigênicos, de acordo com nosso modelo de asma crônica, elegemos a IL-13 como a citocina a ser usada no sistema tridimensional de cultivo de fibroblastos para atuar como indutora de processos relacionados à fibrogênese. Inicialmente observamos que a IL-13 permite uma melhor manutenção de esferóides formados por fibroblastos oriundos de animais saudáveis e “asmáticos”, prevenindo a progressiva diminuição de tamanho dos esferóides ao longo das 96 h de cultivo.

Nossos resultados indicaram que esferóides da condição remodelada apresentam uma deposição de fibronectina aumentada em condições basais. O co-cultivo com IL-13 foi capaz de induzir um “fenótipo asmático” em esferóides da condição controle, onde a adição desta citocina elevou a produção de fibronectina.

A fibronectina é uma glicoproteína que existe na circulação (plasma) na sua forma solúvel e é também encontrada na sua forma insolúvel aderida à MEC (Halliday & Tomasek, 1995). A formação de fibrilas de fibronectina insolúveis, através da polimerização de fibronectina solúvel, é dinâmica e ocorre como um processo mediado pelo citoesqueleto de actina e receptores de integrinas, sobre a superfície de células residentes. Logo, a deposição de fibronectina e a polimerização de actina são dependentes de um estado de tensão isométrica de um substrato tridimensional (Johnson e cols., 2006). Essas considerações demonstram a relevância do estudo dessa proteína, entre outros componentes da MEC, num sistema tridimensional. Semelhante ao observado em relação à fibronectina, o co-cultivo de esferóides da condição controle com IL-13 elevou a produção de colágeno, de maneira comparável ao observado em esferóides da condição remodelada. Esses dados estão em consonância com a literatura, uma vez que, a IL-13 tem sido descrita por aumentar a síntese de arginase I. Esta enzima hidrolisa L-arginina a uréia e L-ornitina, que são metabólitos requeridos para a síntese de colágeno por fibroblastos (Hesse e cols., 2001). Ademais, a produção aumentada de colágeno em modelos animais de asma através da exposição à ovoalbumina também resulta da regulação positiva da síntese de arginase (Zimmermann e cols., 2003).

A IL-13 induz a expressão de diversas quimiocinas como MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-5, eotaxina-1, eotaxina-2 e MIP-1 $\alpha$  (Lukacs e cols., 2001; Zhu e cols., 2002). Em nossos ensaios observamos que esferóides tanto da condição controle quando da condição remodelada apresentam baixos níveis de geração espontânea de eotaxina-1. Entretanto, a adição de IL-13 ao sistema aumenta a liberação de eotaxina em ambas as condições, sendo que esferóides da condição remodelada apresentaram uma liberação dessa quimiocina significativamente maior que aquela observada em esferóides da condição controle. Adicionalmente, verificamos que a IL-13 também foi capaz de elevar a liberação de MCP-1 em esferóides de fibroblastos da condição controle (dados não mostrados). Embora em nosso estudo não tenhamos comparado a liberação de quimiocinas por fibroblastos em monocamadas e em esferóides, dados da literatura mostram que o

agrupamento de fibroblastos em esferóides induz um significativo aumento na liberação espontânea de quimiocinas. O conteúdo do RNAm de várias quimiocinas como CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) e CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL2 e CXCL3, e CXCL8 (IL-8) foi de 6 a 169 vezes maior em esferóides de fibroblastos, 36 h após o início da cultura, do que em células cultivadas em monocamadas. Da mesma forma, os níveis de CCL3, CCL5 e CXCL8 no sobrenadante de esferóides foram significativamente maiores do que em monocamada. Ademais, o meio condicionado de esferóide de fibroblastos induziu a quimiotaxia de neutrófilos do sangue periférico humano e monócitos, sendo esse efeito significativamente inibido por anticorpos contra CXCL8 e o CCR1, respectivamente. A diminuição dos níveis de I $\kappa$ B $\alpha$  e o aumento da atividade do fator de transcrição NF $\kappa$ B também foram observados em esferóides de fibroblastos (Enzerink e cols., 2009).

Alguns estudos propõem que fibroblastos agregados em esferóides param de crescer, passando a uma via de ativação celular que conduz a uma intensa resposta pró-inflamatória e proteolítica, processo este denominado de nemosis. Neste modelo, a ativação de fibroblastos termina em morte celular programada semelhante à necrose, sendo esse fenômeno observado em menos de 24 horas após o início da cultura (Vaehri e cols., 2009). Ademais estudo anterior sugere que células endoteliais estruturadas em esferóides tornam-se não responsivas a fatores de crescimento como VEGF (fator de crescimento endotelial) e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2) e entram rapidamente em apoptose (Korff & Augustin, 1998). Entretanto, nossos achados mostraram claramente que o esferóide da condição normal foi reativo à estimulação com IL-13, mesmo quando esta aconteceu após 72 h de cultivo apenas na presença do meio de cultura. Notou-se significativo aumento da produção de colágeno e eotaxina-1, 24 h depois da exposição a essa citocina, sugerindo fortemente que o sistema como proposto neste estudo apresenta características que estimulam a sua potencial utilização como modelo experimental para avaliação de mecanismos relacionados ao remodelamento pulmonar alérgico, bem como para a triagem farmacológica de novos compostos candidatos a protótipos antiastmáticos.

Nossos resultados em conjunto, evidenciam que foi possível estabelecer modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (cultura 3D), que poderão auxiliar em estudos futuros de elucidação de mecanismos chave na patogenia da asma, bem como no *screening* farmacológico de novos fármacos antiasmáticos.

## 6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- Camundongos Balb/c machos adultos submetidos ao protocolo de sensibilização e desafio antigênico proposto nesta tese respondem, 24 h depois da última provocação, com intensa reação inflamatória pulmonar marcada pelo recrutamento de eosinófilos, geração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de fibrose peribrônquica.
- Fibroblastos pulmonares cultivados em condições propícias a agregação célula-célula, formam esferóides em 24 h, estrutura essa que diminui progressivamente em tamanho em 96 h de cultivo, mas que se mantém reativa a estimulação com IL-13 por pelo menos 72 h.
- Os esferóides formados com fibroblastos pulmonares provenientes de camundongos “asmáticos” (condição remodelada) são maiores e produzem mais fibronectina, colágeno e eotaxina-1 do que o esferóide da condição controle.
- O co-cultivo de fibroblastos da condição normal com IL-13 forma o esferóide característico da condição remodelada, reforçando a relevância do papel transformador dessa citocina no contexto do remodelamento pulmonar alérgico.

Em conjunto, nossos achados fornecem evidências indicativas de que o esferóide de fibroblastos pulmonares constitui-se num sistema de estudo de fibrogênese *in vitro* simples e reprodutivo, com grande potencialidade nos programas de triagem de novos fármacos antiasmáticos e anti-fibróticos.



## 7. Referências bibliográficas

Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, Rennard SI. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170:1158-63.

Bai TR. Evidence for airway remodeling in chronic asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010, 10: 82-6.

Barnes PJ. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 831-44.

Barnes PJ. Drugs for asthma. *Brit J Pharm.* 2006; 147: 297-303.

Barnes PJ & Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet.* 2009;373(9678):1905-17.

Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Draze JM, Fitz GM, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 2008; 31: 143-78.

Bergeron C & Boulet L. Structural changes in airway diseases. Characteristics, mechanisms, consequences and pharmacologic modulation. *Chest.* 2006; 129:1068-87.

Bizik J, Kankuri E, Ristimäki A, Taïeb A, Vapaatalo H, Lubitz W, Vaheri A. Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression. *Cell Death and Differ.* 2004; 11:183-95.

Borregaard N & Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997; 89:3503-21

Boudreau NJ & Jones PL. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem J.* 1999; 339: 481-8.

Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boulet M. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness methacoline. *Chest.* 1997; 112:45-52.

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(5):1720-45.

Braun A, Tschernig T and Groneber DA. Experimental models of asthma. *J Occup Med Toxicol.* 2008; 3:1-3.

Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta.* 2000; 1477(1-2): 267-83.

Broide, DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121:560-70.

Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, Carr D, Barnes PJ, Robinson D, Chung KF. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur Respir J.* 2004; 24: 1222-8.

Burgess JK. The role of the extracellular matrix and specific growth factors in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacol Therapeut. Pharmacol Ther.* 2009; 122(1):19-29.

Busse WW & Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:799-804.

Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:6307-12.

Cohn L, Elias JA, Geoffrey LC. Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:789-815.

Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix to the third dimension. *Science*. 2001; 294:1708-12.

De Lange Davies C, Müller H, Hagen I, Garseth M, Hjelstuen MH. Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures. *Anticancer Res*. 1997; 17:4317-26.

Desmouliere A, Redard M, Darby, I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995; 146, 56-66.

Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005; 13, 7-12.

Dolgachev VA, Ullenbruch MR, Lukacs NW, Phan SH. Role of Stem Cell Factor and Bone Marrow-Derived Fibroblasts in Airway Remodeling. *Am J of Pathol*. 2009; 174(2):390-400.

Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodelling in asthma. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1001-06.

Elias JA. Airway Remodeling in Asthma Unanswered Questions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161:168-71.

Enzerink A, Salmenperä P, Kankuri E, Vaheri A. Clustering of fibroblasts induces proinflammatory chemokine secretion promoting leukocyte migration. *Mol Immunol*. 2009; 46(8-9):1787-95.

Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(1):22-37.

Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 1995; 95:843-52.

Folli C, Descalzi D, Scordamaglia F, Riccio AM, Gamalero C, Canonica GW. New insights into airway remodelling in asthma and its possible modulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008, 8:367-75.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*. 2009; 4 (3):309-324.

Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35: 1251-53.

Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003; 200(4): 500-3.

Galli SJ, Tsai M, Piliponsky, AM. The development of allergic inflammation. *Nature*. 2008; 454:445-54.

Glimelius B, Norling B, Nederman T, Carlsson J. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of

proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS*. 1988; 96:433-44.

Gomperts BN & Strieter RM. Fibrocytes in lung disease. *J Leukoc Biol*. 2007; 82: 449–456.

Halliday NL & Tomasek JJ. Mechanical properties of the extracellular matrix influence fibronectin fibrill assembly *in vitro*. *Exp Cell Res*. 1995; 217: 109-17.

Hardie WD, Stephan WG, Hagood JS. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol*. 2009; 175: 1-14.

Hastie AT, Kraft WK, Nyce KB, Zangrilli JG, Musani AI, Fish JE, Peters SP. Asthmatic epithelial cell proliferation and stimulation of collagen production: human asthmatic epithelial cells stimulate collagen type III production by human lung myofibroblasts after segmental allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165:266-72.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol*. 2001; 167 (11):6533-44.

Hinz B, Celleta G, Tomasek JJ, Gabbiane G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*. 2001; 12:2730-41.

Hinz B & Gabbiane G. Cell matrix and cell-cell contactis of myofibroblasts: role in connective tissue remodelling. *Thromb Haemost*. 2003; 90:993-1002.

Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007; 127:526-37.

Holgate ST & Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Rev Immunol.* 2008; 8:218-30.

Homer RJ & Elias JA. Airway Remodeling in Asthma: Therapeutic Implications of mechanisms. *Physiol.* 2005; 20:28-35.

Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107:295-301.

Huang S, Wiszniewski L, Derouette JP, Constant S. *In vitro* organ culture models of asthma. *Drug Discov Today.* 2009;

Hubert HL & Koessler KK. The pathology of fatal asthma. *Arch Intern Med.* 1922, 30:689-760.

Informações em Saúde. <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>

James AL, Maxwell PS, Pearce-Pinto G, Elliot JG, Carroll NG. The relationship of reticular basement membrane thickness to airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 166: 1590-95.

Jardim JR & Nascimento O. Respiratory health in Brazil. *Chron Respirat Disease.* 2007; 4:45-9.

Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, Barnes PJ. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160:1532-39

Johnson PR. Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001; 28:233-36.

Johnson PR, Burgess JK, Underwood PA, Au W, Poniris MH, Tamm M, Ge Q, Roth M, Black JL. Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113:690-6.

Johnson PR, Burgess JK, Ge Q, Poniris M, Boustany S, Twigg SM, Black JL. Connective tissue growth factors induces extracellular matrix in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Resp Crit Care Med*. 2006; 173(1):32-41.

Kay, AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001; 344:30-7.

Kay AB. Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls. *Curr Opin Pharmacol*. 2003; 3:220-6.

Kasahara K, Shiba K, Ozawa T, Okuda K, Adachi M. Correlation between the bronchial subepithelial layer and whole airway wall thickness in patients with asthma. *Thorax*. 2002; 57:242-46.

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen, LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*. 2003; 83:173–80.

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lötvall J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJM, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. 2003; 22: 374-82.

Korff T & Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 1998; 143:134-52.

Kumar RK & Foster PS. Modeling Allergic Asthma in Mice - Pitfalls and Opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27:267-272.

Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor. *Cell Biol Int.* 1999; 23(3): 157-61.

Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* 2004; 9: 273-85.

Kunz-Schughart JF, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Leoni A. A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-D Culture: The Acid Phosphatase Assay. *J Biomol Screen.* 2007; 12: 925.

Lama VN & Phan SH. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc.* 2006, 3:373-6.

Lambert B, De Ridder L, Slegers G, De Gelder V, Dierckx RA, Thierens H. Screening for supra-additive effects of cytotoxic drugs and gamma irradiation an *in vitro* model for hepatocellular carcinoma. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004; 82:146-52.

Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:449-61

Laurent GJ, Chambers RC, Hill MR, McAnulty RJ. Regulation of matrix turnover: fibroblasts, forces, factors and fibrosis. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35 (4):647-51.



Leslie K, Mitchell OJ, Low R. Lung myofibroblasts. *Cell Motil cytoskeleton*. 1992; 22 (2):92-8.

Lewis CC, Chu HW, Westcott JY, Tucker A, Langmack EL, Sutherland ER, Kraft. Airway fibroblasts exhibit a synthetic phenotype in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115 (3):534-40.

Li X & Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:229-33.

Lloyd CM, Gonzalo JA, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Mouse models of allergic airway disease. *Adv Immunol*. 2001;77:263-95.

Lloyde CM & Robinson DS. Allergen-induced airway remodeling. *Eur Respir J*. 2007; 29:1020-32.

Locke NR, Royce SG, Wainwright JS, Samuel CS, Tang ML. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 36: 625-32.

Ludwig MS, Ftouhi-Paquin N, Huang W, Page N, Chakir J, Hamid Q. Mechanical strain enhances proteoglycan message in fibroblasts from asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34:926-30.

Lukacs NW, Tekkanat KK, Berlin A, Hogaboam CM, Miller A, Evanoff H, Lincoln P, Maassab H. Respiratory syncytial virus predisposes mice to augmented allergic airway responses via IL-13-mediated mechanisms. *J Immunol*. 2001; 167 (2):1060-5.

Magnusson MK & Mosher DF. Fibronectin: Structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18(9):1363-70.

Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004; 59, 469-78.

McMillan SJ & Lloyd CM. Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34:497-507.

Montuschi P, Sala A, Dahlén SE, Folco G. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic airway disease. *Drug Discov Today*. 2007;12(9-10):404-12.

Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*. 1997; 273:1109-23.

Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U. Demonstration of a extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1984; 44:3090-97.

Nihlberg K, Larsen K, Hultgardh-Nilsson A, Malmstrom A, Bjermer L, Westergren-Thorsson G. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res*. 2006, 7:50.

Ordonez C, Ferrando R, Hyde DM, Wong HH, Fahy JV. Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology? *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162 (6):2324-29.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer, EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Mol Cell Biol*. 2007; 8:839-45.

Panettieri RA Jr. Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:S269-S274.

Pare PD, McParland BE, Seow CY. Structural basis for exaggerated airway narrowing. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007; 85: 653-58.

Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, Belperio JA, Keane MP, Strieter RH. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest.* 2004; 114:438-46.

Plante S, Semlali A, Joubert P, Bissonnette E, Laviolette M, Hamid Q, Chakir J. Mast cells regulate procollagen I (alpha(1)) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/ IL-4delta2 ratio. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 1321-27.

Polosa R. An overview of chronic severe asthma. *Intern Med J.* 2008; 38(3):190-8.

Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 2001; 54:577-89.

Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage from atopic asthmatics. Relationship to asthma symptoms, lung function and bronchial responsiveness. *Thorax.* 1993; 48: 26-32

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet.* 1989; 1: 520-24.

Roche WR. Fibroblasts and asthma. *Clin Exp Allergy.* 1991; 21:545-48.

Royce SG, Tan L, Koek AA, Tang ML. Effect of extracellular matrix composition on airway epithelial cell and fibroblast structure: implications for airway remodeling in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009; 102:238-46.

Saotome A, Kanai N, Nagai T, Yashiro T, Tokudome S. Immunohistochemical classification of the localization of laminin in the thickened bronchial epithelial basement membrane of deceased bronchial asthma patients. *Respir Med.* 2003; 97:688-94.

Salmenperä P, Kankuri E, Bizik J, Sirén V, Virtanen I, Takahashi S, Leiss M, Fässler R, Vaeheri A. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction. *Exp Cell Res.* 2008;314(19):3444-52.

Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol.* 2003; 171:380-89.

Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. *J Tissue Cult Methods.* 1992; 14 (2):51-8.

Schwartz, LB. Cellular inflammation in asthma: neutral proteases of mast cells. *Am J Respir Dis.* 1992; 145:18-21.

Scotton CJ & Chambers R. Molecular Targets in pulmonary fibrosis. The myofibroblast in focus. *Chest.* 2007; 132:1311-21.

Shiba K, Kasahara K, Nakajima H, Adachi M. Structural changes of the airway wall impair respiratory function, even in mild asthma. *Chest.* 2002;122:1622-26.

Shinagawa K & Kojima M. Mouse Model of Airway Remodeling Strain Differences. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168: 959-67.

Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors *J Immunol Methods.* 1985; 7;83(2):209-15.

Sugiura H, Liu X, Duan F, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Wang XQ, Mao L, Ahn Y, Ertl RF, Bargar TW, Berro A, Casale TB, Rennard SI. Cultured Lung Fibroblasts from Ovalbumin-Challenged “Asthmatic” Mice Differ Functionally from Normal. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 37:424-30.

Sutherland RM, McCredie JÁ, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 46: 113-20.

Tagaya E & Tamaoki J. Mechanisms of Airway Remodeling in Asthma. *Allergol Int.* 2007; 56:331-40.

Tan A, Levrey H, Dahm C, Polunovsky VA, Rubins J, Bitterman PB. Lovastatin induces fibroblast apoptosis *in vitro* and *in vivo*. A possible therapy for fibroproliferative disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159:220-27.

Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, Royce SG. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther.* 2006;112:474-88.

Tarttesfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *The Lancet.* 2002; 360:1313-22.

Ten Hacken NH, Postma DS, Timens W. Airway remodeling and long-term decline in lung function in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003; 9:9-14.

Timmins NE, Hardling FJ, Smart C, Brown MA, Nielsen LK. Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* 2005; 320: 207-10.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3:349-63.

Vaheri A, Enzerink A, Räsänen K, Salmenperä P. Nemo-sis, a novel way of fibroblast activation, in inflammation and cancer. *Exp Cell Res.* 2009; 315(10):1633-8.

Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignore G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003;123(3):417S-22S.

Vignola AM, Gagliardo R, Siena A, Chiappara G, Bonsignore MR, Bousquet J, Bonsignore G. Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001; 1(2):108-15.

Walpita D & Hay E. Studying actin-dependent processes in tissue culture. *Mol Cell Biol*. 2002; 3: 137-41.

Wang CH, Huang CD, Lin HC, Lee KY, Lin SM, Liu CY, Huang KH, Ko YS, Chung KF, Kuo HP. Increased circulating fibrocytes in asthma with chronic airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(6):583-91.

Ward C, Johns DP, Bish R, Pais M, Reid DW, Ingram C, Feltis B, Walters EH. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(9): 1718-21.

Wegmann M. Animal models of chronic experimental asthma - strategies for the identification of new therapeutic targets. *J Occup Med Toxicol*. 2008; 3(1):S4

Werner S & Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev*. 2003; 83:835-70.

Wilson JW & Bamford TL. Assessing the evidence for remodeling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2001; 14(3):229-47.

Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004;4(2):123-31.

Wills-Karp M & Ewart SL. Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat. Rev. Genet*. 2004. 5: 376-87.

Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran- Hosseini E, Wolyniec WW, Whiteley HE, Thrall RS. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol.* 1999;154:1911-21.

Zhang S, Howarth PH, Roche WR. Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts. *J Pathol.* 1996; 180:95-10.

Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999; 103(6):779-88.

Zhu Z, Ma B, Zheng T, Homer RJ, Lee CG, Charo IF, Noble P, Elias JA. IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol.* 2002; 168 (6):2953-62.

Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest.* 2003; 111 (12):1863-74.

# 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](#)