Denise Simão Carnieli

Inflamação e remodelamento pulmonar em camundongos com sensibilização alérgica em diferentes idades: um estudo comparativo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Thais Mauad

São Paulo

2010

Denise Simão Carnieli

Inflamação e remodelamento pulmonar em camundongos com sensibilização alérgica em diferentes idades: um estudo comparativo

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Thais Mauad

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carnieli, Denise Simão
Inflamação e remodelamento pulmonar em camundongos com sensibilização alérgica em diferentes idades : um estudo comparativo / Denise Simão Carnieli. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Patologia.
Orientadora: Thais Mauad.

Descritores: 1.Asma 2.Camundongos BALB C 3.Inflamação pulmonar 4.Remodelação das vias aéreas

USP/FM/DBD-222/10

Dedicatória

À minha querida mãe Izaura e as minhas irmãs Lívia e Isabella, minhas melhores amigas, por ser o grande alicerce,
a fonte de força,o símbolo de amor,
o exemplo de sabedoria;
responsável pela minha formação como ser humano.

Ao meu querido e amado marido Maurício, meu leal companheiro e amigo,
exemplo de força e dedicação.
Obrigada por todo carinho, incentivo e paciência!

Agradecimentos

À Dra. Elnara Márcia Negri, por me abrir às portas da Faculdade de Medicina da USP.

À Profa. Dra. Thais Mauad, pelos ensinamentos, dedicação, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho e pela oportunidade de crescimento profissional. Muito obrigada por acreditar em mim!

À grande companheira Eliane Yoshioka, pela amizade e apoio durante todo o trabalho.

À amiga Fernanda Arantes, pela motivação, por todo ensinamento e apoio neste trabalho.

Às Amigas Diana, Carla e Hellen, por toda amizade e parceria nestes quatro anos de doutorado.

Aos Amigos da "Sala 1155", companheiros de todos os anos de doutorado e de várias etapas de minha vida, o meu muito obrigado!

À Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff, por todo auxílio e incentivo nestes quatro anos de doutorado.

Aos Professores Doutores Paulo Hilário Nascimento Saldiva e Milton de Arruda Martins, pela sabedoria e exemplo.

À Profa. Dra. Adenir Perini, pelo conhecimento desprendido neste trabalho.

Às Funcionárias do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMUSP, pela confecção de milhares de lâminas.

Às Funcionárias do Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, pela disposição em me ensinar e pelo preparo das colorações de milhares de lâminas.

À Funcionária do Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Patologia da FMUSP, Nilsa Regina Damasceno Rodrigues, pelo preparo histoquímico das lâminas.

A CAPES, pelo auxílio financeiro oferecido em todos estes quatro anos de doutorado.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....ix
Lista de tabelas.....x
Lista de abreviaturas.....xi
Resumo.....xii
Summary.....xv

1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Asma – Definição e Fisiopatologia..... 2
1.2 Asma Pediátrica – Prevalência..... 4
1.3 Asma Pediátrica..... 5
1.4 Biópsias Brônquicas em Crianças Asmáticas..... 7
1.5 Modelos Experimentais..... 8

2 OBJETIVOS..... 10

3 MATERIAL E MÉTODO..... 12
3.1 Comissão de Ética..... 13
3.2 Animais..... 13
3.3 Protocolos de Sensibilização e Exposição..... 14
3.4 Método..... 16
3.4.1 Avaliação da responsividade brônquica..... 16
3.4.2 Anafilaxia cutânea passiva (PCA) para IgE e IgG1-OVA específica..... 17
3.4.3 Preparação do tecido..... 19
3.4.4 Histoquímica..... 19
3.4.5 Imunohistoquímica..... 19
3.4.6 Morfometria..... 20
3.5 Análise Estatística..... 21

4 RESULTADOS..... 23

4.1 Responsividade das Vias Aéreas..... 26
4.2 Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) para IgE e IgG1-OVA específica..... 28
4.3 Inflamação..... 28
4.4 IL-5 e TGF-β..... 30
4.5 Hiperplasia das Células Caliciformes..... 31
4.6 Fibras de Colágeno..... 32
4.7 Músculo Liso da Via Aérea..... 33

5 DISCUSSÃO..... 35

6 CONCLUSÕES..... 42

7 ANEXOS
Anexo 1 Aprovação de Comissão de Ética para análise de Pesquisa (CAPPesq)..... 45

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 48

APÊNDICE
Apêndice 1 Artigo submetido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Protocolo experimental de sensibilização alérgica utilizado neste estudo..... 15

Figura 2 Painel de figuras evidenciando a presença de inflamação nas vias aéreas dos animais sensibilizados e expostos a OVA..... 25

Figura 3 Efeito da sensibilização alérgica na responsividade pulmonar..... 27

Figura 4 Densidade peribrônquica de eosinófilo e linfócitos..... 29

Figura 5 Densidade peribrônquica de células IL-5 e expressão de TGF-β.. 31

Figura 6 Hiperplasia da célula caliciformes..... 32

Figura 7 Conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas..... 33

Figura 8 Conteúdo de ASM nas vias aéreas..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Anticorpo utilizado para realizar Imunohistoquímica..... 20

Tabela 2 Produção de anticorpo anafilático em camundongos imunizados com OVA..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS

BM	Membrana Basal
CAPPesq	Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa
DP	Desvio Padrão
ED50	Dose Efetiva de Sensibilidade
H&E	Hematoxilina eosina
i.p	Intraperitoneal
IL-5	Interleucina-5
ISAAC	Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância
LIM-05	Laboratório de Investigação Médica 05 (Poluição Atmosférica Experimental)
Mch	Metacolina
MLB	Músculo Liso Brônquico
OVA	Ovalbumina
PAS/AB	PAS- Alcian-Blue
PBS	Solução Tamponada de Fosfato
PCA	Anafilaxia Cutânea Passiva
Penh	"Pausa maior" ou "*enhanced pause"*
PEP	Pico de Fluxo Expiratório
PIP	Picos de Fluxo Inspiratórios
TE	Tempo de Expiração
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento Beta
TR	Tempo de relaxamento
VEF1	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo

RESUMO

Carnieli DS. *Inflamação e remodelamento pulmonar em camundongos com sensibilização alérgica em diferentes idades: um estudo comparativo. [Tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 87p.

A prevalência mundial de asma na infância é alta. Alterações estruturais das vias aéreas são observadas na asma, e podem ocorrer precocemente na infância. Este estudo tem como objetivo comparar os resultados de um modelo de sensibilização alérgica, em camundongos de diferentes idades. Para tanto foram utilizados camundongos Balb/C pré-desmamados, jovens e adultos. O grupo de animais pré desmamados foram divididos em outros dois grupos (18D – 18D1), sendo que ambos foram sensibilizados com duas injeções intraperitoneal (i.p.) de 10 µg ovalbumina (OVA) no 5º e 7º dia de vida. Após, o primeiro grupo de camundongos pré desmamados foram submetidos a 01 (um) desafio, este consistente em receberem inalações por 3 dias consecutivos, a 3% de OVA, por 10 minutos, nos dias 14, 15 e 16. O segundo grupo de camundongos pré desmamados foram submetidos 02 (dois) desafios, estes nos dias 09, 10 e 11; e 14, 15 e 16 dias de vida. O grupo de camundongos jovens (40D) receberam as mesmas inalações nos dias 22 a 24 e depois nos dias 36 a 38. Um quarto grupo de camundongos, denominados adultos (100D), foram sensibilizados com 10 µg OVA i.p. nos dias 60 e 62 de vida; e também recebendo inalações por 3 dias consecutivos a 3% de OVA, por 10 minutos, nos dias 77 a 79 de vida, repetindo o procedimento nos dias 96, 97 e 98, sendo que os animais em todos os

grupos foram sacrificados 48hs após a última inalação. Todos os grupos possuíam um grupo controle respectivo, mesmo protocolo, mas ao invés de OVA, recebiam apenas solução salina. Observamos que os animais sensibilizados, quando comparados entre si, não apresentavam diferença quanto à densidade de células de eosinófilos ($p = 0,052$). A densidade de células TCD3+ foi maior nos camundongos adultos e no grupo de animais pré desmamados com dois desafios ($p<0,001$), não havendo diferença nos demais grupos ($p=1,000$). Foi possível observar também uma maior expressão de IL-5 nas vias aéreas quando comparados os grupos OVA de 18 dias de vida (18D e 18D1) com os seus controles ($p=0,017$). Todavia não houve esta diferença de IL-5 nos grupos jovens e adultos. Entre os grupos controles, a expressão de IL-5 foi menor nos grupos de 18 dias de vida (18D e 18D1) em relação aos animais dos grupos de 40 e 100 dias de vida (40D e 100D - $p<0,001$). Verificamos ainda que o grupo de animais pré desmamados com um desafio ($p = 0,003$) e os camundongos adultos ($p = 0,006$) apresentaram aumento da expressão de TGF-β nas vias aéreas, quando comparados aos seus respectivos controles; e que os camundongos do grupo pré desmamado com um ou dois desafios apresentaram maior expressão de PAS no epitélio bronquiolar, quando comparado aos camundongos jovens e adultos (18D e 18D1 - $p=0,007$ e 40D e 100D - $p=0,073$). Entre os camundongos sensibilizados, o grupo pré desmamado com um único desafio, apresentou menor fração de área de colágeno comparado ao grupo de camundongos pré desmamados que receberam dois desafios ($p<0,001$), não havendo outras diferenças entre os grupos.

Camundongos jovens e adultos apresentaram um aumento de espessura do músculo liso da via aérea (MLB) quando comparados a seus respectivos controles (p = 0,048). Desta forma, foi possível demonstrar que os camundongos pré desmamados podem desenvolver alterações inflamatórias e estruturais nas vias aéreas, porém apresentam características diferentes das alterações observadas em animais com maior idade. Por fim, conclui-se que o presente estudo proporciona resultado e forma a ser utilizado como base para um estudo experimental, seja para verificar o resultado de medicamentos, seja para um estudo comparativo em crianças, jovens e adultos com asma, a fim de se verificar as diferenças apresentadas; e assim, auxiliar na adequada conduta clínica para prevenção ou combate dessa doença.

Descritores: Asma. Camundongos. BALB/c. Inflamação pulmonar. Remodelação das vias aéreas

SUMMARY

Carnieli DS. *Inflammation and Remodeling in infantile, juvenile and adult Allergic Sensitized mice* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 87p.

The prevalence of childhood asthma is high worldwide. Recent data indicate that asthma structural changes occur early in childhood, and that structure alterations occur early in life. In this study we have aimed to compare a model of allergic sensitization in infantile, juvenile and adult mice. BALB/c mice at different ages were sensitized with two intraperitoneal injections (i.p.) of 10 µg ovalbumin (OVA) at day 05 and 07 and received 3 daily inhalations of 3% OVA for 10 min on days 14 to 16 and 09 to 11 - 14 to 16 the infantile groups (18d - 18d1).The juvenile mice (40d) at days 22 to 24 - 36 to 38 and adult mice (100d) were sensitized with 3% OVA i.p. at day 60 and 62 and received 2x 3 daily inhalations at days 77-79 and at day 96-98, being euthanized 48h later. Control groups received saline using the same protocols. The OVA treated animals were compared among each other there were no differences regarding eosinophil cell density (p= 0.052). The density of T CD3+ cells was higher in the adult mice and in the infantile group with two challenges in relation to 18D e 40D (p=0.000), but without differences between the former groups (p= 1.000). When OVA groups were compared to the respective controls, infantile groups presented increased IL-5 expression in the airways (p=0.017), no differences were observed in the juvenile and adult mice. Among controls, IL-5 expression was lower in the infantile groups in relation to the juvenile and adult mice (p<0.001). The infantile group (p=0.003) with one challenge and the adult mice (p=0.006) presented increased TGF-β expression in the airways when compared to their respective controls. Infantile mice with one or two challenges presented more PAS positivity in the bronchiolar epithelium than the juvenile and adult mice (p=0.007 and p=0.073). Among the OVA mice, infantile mice with one

challenge presented lower collagen area fraction than the group of infantile mice that received two challenges (p=0.000), without further differences among groups. Juvenile and adult mice had increased ASM thickness when compared to their age related controls (p=0.48). In summary, we have shown that infantile mice develop inflammatory and structural alterations in the airways, but that are partially different from those developed in older animals. Understanding the phenotypic differences in children vs adult asthma is very important to treat disease adequately and to manage prevention of severity.

Descriptors: Asthma. Mice. BALB/c. Pulmonary inflammation. Airway remodeling

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma – Definição e Fisiopatologia

A asma é um distúrbio inflamatório crônico das vias aéreas, constituindo-se de complexas interações entre os mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, neutrófilos, células epiteliais e mediadores inflamatórios (GINA, 2006). Esta inflamação e suas conseqüentes mudanças estruturais nas vias aéreas contribuem para a obstrução das vias aéreas e aumento da hiperresponsividade brônquica. Após uma variedade de estímulos, pacientes asmáticos podem apresentar episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, os quais são comumente observados à noite e ao despertar (Djukanovic et al., 1990; Warman et al., 2001; Hargreave , Nair, 2009)).

Para se desenvolver um quadro asmático é necessário que, primeiramente, haja a sensibilização a algum antígeno, de modo a fazer com que as células dendríticas da mucosa brônquica (atuando como antígenos) interajam com os linfócitos T; e assim, provocando os linfócitos B a produzirem imunoglobulinas (IgE), a serem liberadas na circulação sanguínea para se unirem aos mastócitos; o que, por sua vez, desencadeará um processo inflamatório.

,O paciente asmático pode apresentar obstrução das vias aéreas, devido à contração da musculatura lisa brônquica, em dois momentos

distintos: imediatamente ao contanto com o alérgeno, instalando-se em poucos minutos e com duração de até 2h conhecido como fase imediata da doença ou tardiamente, ocorrendo após a 3ª hora do primeiro contato com o alérgeno, conhecido como fase tardia da asma (Stumbles et al., 1998; Vieira et al., 2007).

Existem evidências que o diagnóstico recente de pacientes asmáticos sugerem que o processo inflamatório possui papel fundamental na fisiopatologia da asma (Laitinen et al., 1993). A literatura ainda evidencia, seja em estudos experimentais ou humanos, que o processo inflamatório da asma não se restringe às grandes vias aéreas, sendo possível observá-la nas vias aéreas pequenas (Balzar et al., 2002; Tulic, Hamid, 2003), no parênquima pulmonar (Xisto et al., 2005; Lancas et al., 2006) e nos vasos pulmonares (Sur et al. 1999, Singh et al., 2005).

A asma é caracterizada por uma resposta denominada tipo Th_2, a qual desencadeia a liberação de citocinas típicas como as Interleucinas 4 (IL-4), 5 (IL-5) e 13 (IL-13). Em modelos experimentais de inflamação alérgica, com sensibilização com ovalbumina (OVA), observamos que há a mesma liberação de citocina Th_2, particularmente a IL-4 e IL-5, sendo que a IL-4 é capaz de perpetuar a ativação dos mastócitos, estes responsáveis pela liberação de IgE e IgG1, a qual induz a ativação dos eosinófilos, assim como estimulam a produção de muco. Já a IL-5 estimula a proliferação e ativação dos eosinófilos (Vieira et al., 2007).

O remodelamento brônquico na asma é caracterizado pelo aumento de deposição de proteínas de matriz extracelular nas vias aéreas, o que

ocasiona a fibrose subepitelial, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, bem como a hiperplasia das glândulas submucosas, o que leva a um espessamento da parede brônquica e menor calibre brônquico. Tais alterações também são observadas em pacientes asmáticos e em estudos experimentais, sugerindo que o remodelamento brônquico é devido à liberação de diversos fatores inflamatórios, de crescimento celular e de liberação de citocinas (Johnson, Knox, 1997; Vieira et al., 2007; Begueret et al., 2007). Assim, concluem que a melhor compreensão da fisiopatologia da asma e o seu adequado tratamento estão nas estratégias preventivas da doença.

1.2 Asma Pediátrica – Prevalência

A asma na infância tem alta prevalência mundial. Recentes dados do ESTUDO INTERNACIONAL DE ASMA E ALERGIA NA INFÂNCIA (ISAAC - fase três) indicam que há prevalência de chiado em 11,5% das crianças de 6 a 7 anos e 14,1% em adolescentes, levando-se em consideração as amplas variações geográficas. A literatura ainda aponta que a asma grave atinge 4,9% e 6,9% das crianças e adolescentes, respectivamente (Pearce et al., 2007).

No Brasil, o ISAAC (fase três) observou que há um alto grau de prevalência de chiado em crianças na idade escolar e adolescente, sendo estes representados pelos percentuais de 24,3% e 19%, respectivamente (Solé et al., 2006).

1.3 Asma Pediátrica

Em crianças com até 5 anos de idade, os sintomas clínicos da asma são variáveis e não-específicos. Além disso, a limitação do fluxo aéreo, a inflamação das vias aéreas e as características patológicas principais ocasionadas pela doença, não podem ser avaliadas rotineiramente neste grupo etário. Assim, para auxiliar no diagnóstico de asma em crianças pequenas, os sintomas e a abordagem descritiva são decisivos para a definição dos diferentes fenótipos de sibilância (GINA, 2006).

Vários são os fatores que podem contribuir para o aumento da asma na infância. O número maior de sobrevivência de fetos prematuros com pulmões não totalmente desenvolvidos, ou ainda o crescimento do número de mulheres grávidas fumantes. O que leva a uma maior probabilidade de bebês com baixo peso e capacidade pulmonar reduzida, alterando, assim, o crescimento das vias aéreas e dos pulmões do feto, o que leva a um aumento da resistência das vias aéreas, e maiores riscos de sibilância nas primeiras fases da vida (Asma brônquica, 2008). Além destes fatores, ainda é preciso levar em consideração o grande número de famílias que possuem condições sociais precárias, posto que crianças nestas condições são freqüentemente expostas a alérgenos, como é o caso dos poluentes e do fumo passivo, além de possuírem menos acesso a serviços médicos (Gelfand, 2008).

O objetivo do tratamento é conseguir o controle das manifestações clínicas da doença, mantendo-se este controle por tempo prolongado.

Observa-se ainda que o controle da asma pode ser alcançado na maioria das crianças de até 5 anos, bastando uma estratégia de intervenção farmacológica, a ser desenvolvida em parceria com família/cuidador e o profissional de saúde. Em crianças com idade superior a 5 anos e menores, assim como em adultos, a inaloterapia constitui o *gold standard* em tratamento da asma (GINA, 2006).

Há evidências de que existem grandes diferenças fenotípicas entre a asma em crianças e da asma em adultos (Gelfand, 2008).

Observa-se que quando a asma tem início na idade adulta, os sintomas tendem a ser persistentes e graves; e a maioria dos pacientes não são atópicos. Já em crianças, a asma apresenta-se com um caráter mais episódico e geralmente está relacionada à atopia (Gelfand, 2008), mas os sintomas clínicos são freqüentemente observados apenas na adolescência (GINA, 2006).

Existe possibilidade da asma adquirida na infância poder regredir na fase adulta. No entanto, quando há sintomas graves na infância, maiores são as chances de recidiva na vida adulta (Horner, Strunk, 2007). No caso de adolescentes asmáticos sem sintomas, estudos mostram que há sinais de inflamação persistente e alterações da função pulmonar, tais como hiperinflação e/ou aumento do volume residual quando na fase adulta (Berhane et al., 2000; Sears et al., 2003; Morgan et al., 2005).

1.4 Biópsia Brônquica em Crianças Asmáticas

Achados patológicos em biópsias de crianças asmáticas revelam precoce anomalias estruturais, tais como espessamento da membrana basal e aumento da musculatura lisa brônquica (Saglani et al., 2007, Sly, 2006). Contudo, essas alterações, via de regra,não estão presentes em crianças que apresentam chiado, mas podem aparecer em crianças com menos de três anos. Já em crianças com asma grave, estudos mostram que há um aumento na quantidade de massa do músculo liso das vias aéreas (Jenkins et al., 2003; Bush, 2008a).

Estudos elucidam também que, na asma pediátrica, as alterações estruturais podem ocorrer precocemente e, até mesmo, desvinculadas da inflamação das vias aéreas (Bush, 2008a).

Payne et al. (2003), observaram que crianças com asma grave apresentam espessura de membrana basal semelhante à de adultos com asma leve a moderada, porém não encontraram correlação entre a duração da doença, os níveis de volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e a inflamação eosinofílica.

De forma similar, Gelfand (2008) demonstrou em seu estudo, que crianças com asma grave apresentam espessamento da membrana basal, mesmo não desenvolvendo infiltrado inflamatório importante na via aérea e com prova de função pulmonar preservada.

Por fim, A relação da membrana basal (BM) com gravidade, duração da doença e níveis de função pulmonar tem sido bastante inconsistente em diversos estudos.

1.5 Modelos Experimentais

Os modelos experimentais de sensibilização alérgica têm sido amplamente utilizados para se analisar os mecanismos da doença, bem como o comportamento dos genes e células, até mesmo com a finalidade de prever a segurança de novos medicamentos ou produtos químicos, antes de serem utilizados em estudos clínicos. Os modelos experimentais também contribuíram de forma significativa para o avanço no entendimento da fisiopatologia da asma enquanto doença alérgica de via aérea (Shin et al., 2009).

Dentre os modelos experimentais de doença alérgica das vias aéreas, os camundongos apresentam inúmeras vantagens, posto que, diferentemente dos outros animais, permitem a identificação de células, genes e mecanismos de inflamação das vias aéreas e responsividade brônquica (Shin et al., 2009; Takeda, Gelfand, 2009; Sly, Zosky, 2007).

Ademais, trata-se de espécie que possui compreensão detalhada de sua genética.Tornando-a adequada para a investigação do papel dos fatores imunes humoral no desenvolvimento de doença alérgica das vias respiratórias, além de oferecer a oportunidade de explorar os mecanismos

de reações alérgicas, devido à disponibilidade de numerosos reagentes imunológicos, como os anticorpos contra citocinas, os fatores de crescimento e os marcadores da superfície celular (Shin et al., 2009).

Recentemente, modelos experimentais de asma neonatal/juvenil foram desenvolvidos (Ohki et al., 2005, Mayuzumi et al., 2007; Saglani et al., 2009); e estes estudos foram capazes de demonstrar características de inflamação alérgica das vias aéreas, como o observado em animais adultos.

Além disso, alguns autores evidenciaram que estes animais desenvolvem sinais de remodelamento das vias aéreas, em paralelo à inflamação (Saglani et al., 2009); e poucos são os ensaios que comparam o desenvolvimento, a magnitude da inflamação alérgica das vias aéreas e o remodelamento brônquico em animais neonatos ou pré-desmamados, juvenil e adulto.

Assim, visto a prevalência da doença, os sinais clínicos e o diagnóstico precoce em crianças com até cincos anos de idade e suas diferenças clínicas comparadas a asma no adulto, buscamos por meio deste estudo apresentar um modelo experimental que possa auxiliar na pesquisa e entendimento da asma pediátrica, assim como na compreensão de suas diferenças em relação à asma em adultos. Procurando observar presença de células inflamatórias nas vias aéreas dos animais, assim como a expressão de citocinas pró-inflamatórias, hiperessponsividade das vias aéreas, além de alterações estruturais, como deposição de fibras de colágeno, hiperplasia de células caliciformes e diferenças entre a espessura da musculatura lisa brônquica.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver um modelo de sensibilização alérgica com ovalbumina intraperitoneal em camundongos pré desmamados, jovens e adultos;

2. Verificar a hiperresponsividade das vias aéreas em camundongos pré desmamados, jovens e adultos sensibilizados e expostos a OVA ;

3. Comparar a presença de células inflamatórias nas vias aéreas de camundongos pré desmamados, jovens e adultos sensibilizados e expostos a OVA ;

4. Comparar a expressão de citocina pró-inflamatória e a expressão de TGF-β nas vias aéreas de camundongos pré desmamados, jovens e adultos sensibilizados e expostos a OVA ;

5. Comparar as alterações estruturais, como a hiperplasia de células caliciformes, a deposição de colágeno e o conteúdo de fibras musculares nas vias aéreas de camundongos pré desmamados, jovens e adultos sensibilizados e expostos a OVA e verificar se estas alterações serão mais evidentes no grupo de animais jovens;

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Comissão de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) sob o Protocolo de Pesquisa nº. 1253/05.

3.2 Animais

Foram utilizados de 6 a 8 camundongos em cada grupo, sendo machos e fêmeas da linhagem Balb/C, divididos em pré desmamados, com 5 dias de vida e adultos, com 06 semanas de vida. Os animais eram provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, permanecendo no biotério do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM – 05), o qual possui bioterista próprio e todo o material de manutenção necessário para os animais, estando de acordo com o “Guide for care and use of laboratory animals” (NIH publication 85-23, revised 1985).

3.3 Protocolos de Sensibilização e Exposição

O protocolo de sensibilização foi baseado no modelo proposto por Hamada e cols. (1999). Os grupos de tratamento com ovalbumina (OVA) (Advanced Nutrition, RJ, Brasil) foram imunizados com 5 dias de vida, com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 μg de OVA com 1 mg de Al $(OH)_3$ em 0,1 ml de solução tamponada de fosfato (PBS), repetindo-se o procedimento aos 7 dias de vida.

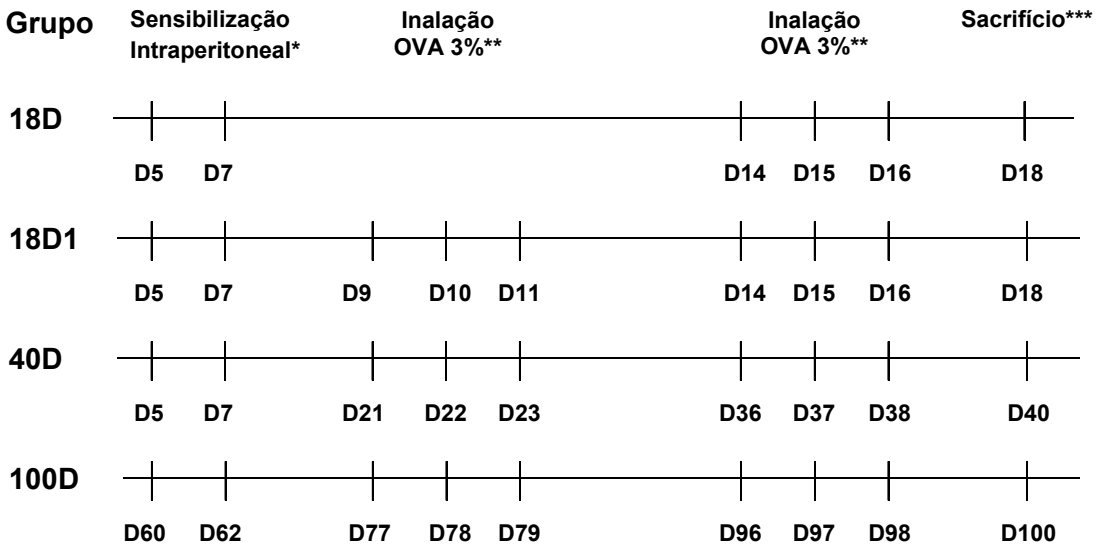
Os animais foram divididos em três grupos, sendo que um grupo foi desafiado com aerossol solução de OVA 3%, utilizando um nebulizador ultra-sônico (Pulmoclear Luxo II - Soniclear, São Paulo, Brasil), por 10 minutos por dia, em três dias consecutivos, a contar do 14 º dia de vida até o 16º e sacrificados no 18 º dia. O segundo grupo recebeu os mesmos desafios, mas em duas oportunidades, e estas foram nos dias 9, 10 e 11; e nos dias 14, 15 e 16 de vida, sendo sacrificados no 18º dia.

O terceiro grupo recebeu os mesmos desafios, agora nos dias 21 a 23 e 36 a 38, e foram sacrificados no 40 º dia de vida.

Um quarto grupo, formado por camundongos adultos com 60 dias de vida, foi imunizado (i.p.) com 10 μg de OVA (Advanced Nutrition, Rio de Janeiro, Brasil), com 1 mg de Al $(OH)_3$ em 0,1 ml de PBS, seguido de uma nova e idêntica injeção aos 62 dias de vida. Estes animais também foram desafiados com aerossol de solução OVA a 3%, utilizando o mesmo nebulizador ultra-sônico, por 10 minutos ao dia, em três dias consecutivos,

sendo estes os dias 76, 77 e 78 de vida; repetindo-se nos dias 96 a 98, e sendo sacrificados no 100º dia.

Os grupos controle receberam uma injeção i.p. do veículo (1mg $Al(OH)_3$ em 0,1ml PBS), assim como foram desafiados com aerossol, mas apenas com solução salina, utilizando também o nebulizador ultra-sônico, conforme períodos realizados nos grupos de tratamentos, bem como respeitando-se os mesmos protocolos, de acordo com a sua faixa etária, ou seja, de camundongos pré desmamados, jovens e adultos. O desenho do estudo está representado na Figura 1.



D = Dias de vida
* OVA 10 μg com 1 mg de Al $(OH)_3$ em salina 0.1ml (0.9% NaCl)
** Inalação de OVA 3% ou salina, 10 minutos por dia, em 3 dias consecutivos em todos os experimentos
*** Sacrifício após 48h após a última inalação

Figura 1. Protocolo de Sensibilização. (D = Dias de vida).

3.4 Método

3.4.1 Avaliação da Responsividade Brônquica

A avaliação observou a responsividade brônquica dos camundongos 48h após a última inalação com solução de OVA ou salina. Nesse momento, foi mensurado a respossividade pulmonar dos camundongos para metacolina (Mch), através de um sistema de pletismografia de corpo inteiro (BUXCO, Winchester, Reino Unido).

Nesse ponto, vale explicar os motivos determinantes para utilização deste aparelho (BUXCO), pois o mesmo possibilita a avaliação de responsividade brônquica não somente nos animais jovens e adultos como também nos pequenos animais (grupo de animais pré desmamados).

Assim, cada camundongo foi colocado em uma câmara, onde respiravam espontaneamente para que fossem coletados os valores de fluxo. O pletismógrafo é composto de dois orifícios que permitem a comunicação do interior da câmara com o meio externo – sendo estes chamados de pneumotacógrafos. O valor de pressão coletado está relacionado ao fluxo de entrada e saída de ar da câmara, verificado pelo pneumotacógrafo. Vale ressaltar que o pletismógrafo é calibrado a fim de estimar o fluxo e o volume provenientes do sinal da câmara. Assim, o tempo de expiração (TE) e relaxamento (TR - tempo de decaimento de até 36% da pressão total da câmara durante a expiração), o pico inspiratório e o pico expiratório foram transmitidos pelo sinal de pressão da câmara. Já os picos de fluxo inspiratórios (PIP) e o pico de fluxo expiratório (PEP) foram

calculados partindo das pressões dos picos inspiratórios e expiratórios conforme descrito por Hamelmann et al., (1997). Desse modo, utilizamos as fórmulas abaixo, a fim de obter os valores da "pausa aumentada" ou *enhanced pause* (Penh):

$$\textbf{Pausa} = \frac{\textbf{TE} - \textbf{TR}}{\textbf{TR}} \qquad \textbf{Penh (Enhanced Pause)} = \frac{\textbf{PEP x Pause}}{\textbf{PIP}}$$

Os estudos existentes evidenciam o Penh como o principal indicador da broncoconstrição das vias aéreas, representado pela sua correlação com a resistência das vias aéreas, medida de acordo com métodos normalizados de avaliação em camundongos BALB/c (Adler et al., 2004; Lomask M. 2006).

Os dados foram coletados segundo descrito por Hamelmann et al., (1997), de modo que as câmaras foram nebulizadas por três minutos com solução salina; e após a ambientação dos animais, foram seguidos de nebulização de soluções de metacolina (Mch) em concentrações crescentes (6, 12, 25, 50 mg/ml), com a realização da mensuração por cinco minutos. Assim, com uma média de 25 ciclos respiratórios e a média dos valores acumulados, expressos em cada concentração de Mch, foram calculados os valores do Penh (Vieira et al., 2007).

Os resultados foram expressos como valores de Penh, Penh máx e valores de 50% da dose efetiva de sensibilidade (ED50).

3.4.2 Anafilaxia cutânea passiva (PCA) para IgE e IgG1-OVA específica

A mensuração dos títulos de IgE anafilático e IgG_1-OVA de anticorpos específicos foi realizada através da técnica de Anafilaxia Cutânea Passiva -

PCA, conforme descrito por Ovary (1964) e modificado por Mota e Perini (1970).

O titulo dos anticorpos da classe IgE anti OVA foi determinado pela reação de PCA em ratos, visto que somente esta classe de anticorpos de camundongo é capaz de sensibilizar a pele do rato. Ratos *Wistar Furth* normais foram previamente tricotomizados no dorso e injetados intradermicamente com 100ul de diluições seriadas das amostras de plasma, estas obtidas de camundongos submetidos ao protocolo de imunização. Após um período de latência de 24 horas, os animais foram inoculados pela via endovenosa com 1,0 ml de solução azul de Evans a 0,5% contendo 1 mg de OVA/ml.

Já para a titulação da classe IgG_1, foram utilizadas alíquotas de plasma inativada por 1 hora, em banho maria a 56°C, a fim de destruir a atividade devida aos anticorpos da classe IgE. Camundongos BALB/c normais foram previamente tricotomizados, no dorso e injetados intradermicamente com 50ul de diluições seriadas das amostras dos plasmas obtidos de camundongos, estes submetidos a diferentes protocolos de imunização. Após um período de 2 horas, os animais foram inoculados pela via endovenosa com 0,5ml de solução azul de Evans a 0,5% contendo 1mg de OVA /ml.

As leituras das reações foram realizadas 30 minutos após o desafio com antígeno. Os títulos do PCA para IgE ou IgG_1 OVA específico foram expressos com a recíproca da maior diluição dos plasmas que apresentaram uma reação de 5mm de diâmetro (Mota e Perini,1970).

3.4.3 Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados com pentobarbital sódico (50 mg / kg de peso corporal, ip), sendo a caixa torácica aberta, com retirada de todo o pulmão, traquéia e coração; após, foram fixados por meio de instilação intratraqueal de formol (formaldeído 4% em tampão de 2%), e decorridas 24 horas, foram incluídas em parafina. Os cortes para amostras de tecido pulmonar foram em sentido transversal e preparados para a imunohistoquímica, a fim de permitir a análise das estruturas.

3.4.4 Histoquímica

Os cortes histológicos foram corados por Hematoxilina Eosina (H&E) para análise histopatológica de Picrossirius-Hematoxilina, o que permitiu estudar as fibras de colágeno e PAS- Alcian-Blue (PAS/AB). Para análise da hiperplasia das células caliciformes, assim como o Tricrômio de Masson, foram analisadas as fibras musculares e a coloração Luna, esta para quantificar os eosinófilos (Lanças et al., 2006).

3.4.5 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada utilizando anticorpos policlonais de ratos anti-CD-3 (1:300, Serotec Inc., Raleigh, Carolina do Norte) e de coelhos anti interleucina-5 (IL-5) (1:800, Santa Cruz Biotechnology, CA) e fator transformador de crescimento beta (TGF-β) (1:1200, Santa Cruz Biotechnology, CA), tabela 01.

Os cortes foram desparafinizados e aplicados em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% por 35 minutos, com o fim de inibir a atividade da peroxidase endógena. A recuperação de antígenos foi realizada com solução de citrato durante 45 minutos. As seções foram incubadas com o anticorpo primário durante a noite, em uma temperatura de 4°C, e o método streptavidina biotina peroxidase (Vectastain, Irvine, CA) foi utilizado como anticorpo secundário; e 3,3 de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) como cromógeno. Todas os cortes foram corados em 1 sessão de coloração, usando anticorpos provenientes de um único lote. Para controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por PBS.

Tabela 1. Anticorpo utilizado para realizar Imunohistoquímica.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Clone	Fornecedor
IL-5	Coelho	1:800	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology,, CA
TGF-β	Coelho	1:1200	Policlonal	Santa Cruz Biotechnology,, CA
CD3	Rato	1:300	Policlonal	Serotec, Raleigh, Carolina do Norte

3.4.6 Morfometria

Para a quantificação da densidade das vias aéreas de eosinófilos e células TCD3+, utilizamos à técnica de contagem de pontos (Vieira 2007). A referida contagem foi realizada através de um retículo com 168 pontos, acoplado a um microscópio eletrônico, com área conhecida de 11.449 μm² em um aumento de 1000x, sendo verificado 25 campos de vias aéreas (média de 5 vias aéreas) de cada animal. O músculo liso da via aérea (MLB)

e a quantidade de área epitelial corada por PAS/AB foram mensurados pela contagem de pontos sob o músculo e área epitelial corada por PAS/AB, dividido pelo número de intercepto de membrana basal (Vieira et al., 2007). Os resultados foram expressos como número de pontos sob o músculo liso e área epitelial corada por PAS/AB por intercepto de BM.

O colágeno da via aérea, e a expressão do TGF-β e IL-5 foram obtidos por meio de análise de imagem, utilizando o software Image-Pro ® Plus 4.5 para Windows ® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, E.U.A.), em um microcomputador compatível ligado a uma câmera digital e acoplada a um microscópio de luz (Leica DMR, Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemanha). Neste contexto, foram analisados 5 vias aéreas por animal, totalizando 25 campos, com uma ampliação de 400x. A área demarcada positiva foi dentro da parede das vias aéreas ou do epitélio e foi determinada pelo limite de cores. Os resultados foram expressos em percentagem de colágeno, TGF-β e IL-5 [área positiva (μm^2)], dividido pela área total das vias aéreas (μm^2).

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS versão 15.0® (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e interquartil, e expressos como média; Já os dados paramétricos foram na forma de media ± desvio padrão (DP). A significância estatística entre dois

grupos foi avaliada por testes T de *Student* ou teste de *Mann-Whitney*. Para comparações entre 2 grupos, a análise de variância (dados paramétricos), ou Kruskall-Wallis (dados não-paramétricos), foi seguido do post-hoc de Bonferroni. O nível de significância foi ajustado para $p < 0,05$ (Zar, 1984).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Observamos que todos os grupos experimentais sensibilizados e expostos a OVA apresentaram sinais de inflamação alérgica das vias aéreas, caracterizada pela presença de eosinófilos e pela maior produção de muco, quando comparados ao respectivo grupo controle. (Figura 2).

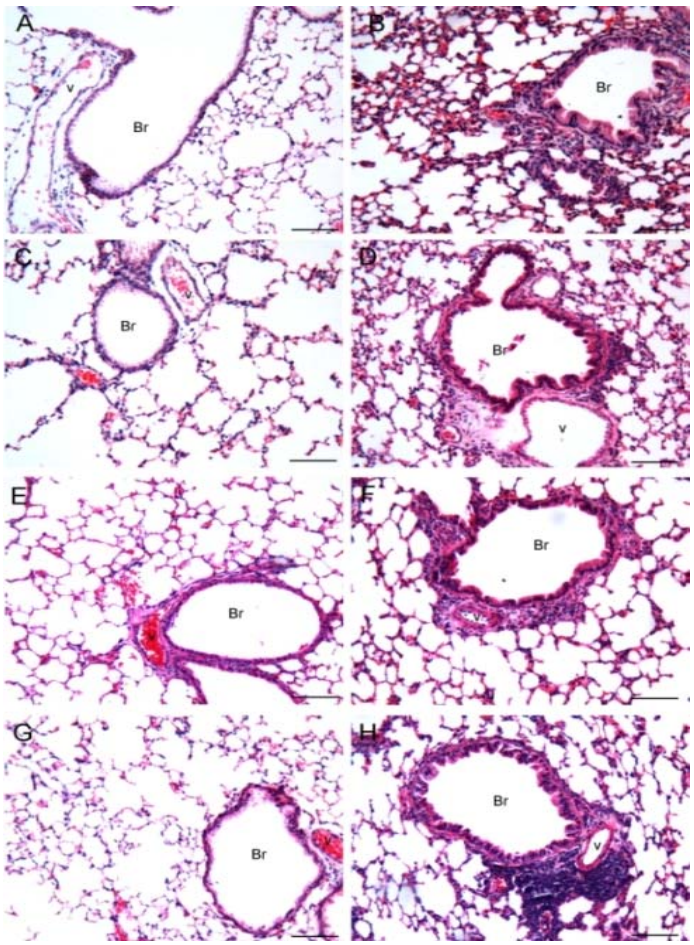


Figura 2. As figuras mostram a via aérea de camundongos em diferentes idades. O painel da direita (A, C, E, F) são vias aéreas de camundongos em diferentes idades do grupo controle. Já o painel da esquerda (B, D, E, H) mostra a presença de inflamação e remodelamento das vias aéreas em camundongos com inflamação pulmonar alérgica, sendo (**B) -** Camundongos pré-desmamados com um desafio inalatório; (**D)** - Camundongos pré-desmamados com dois desafios inalatórios; (**F) -** Camundongos Jovens; e (**H) -** Camundongos Adultos. A escala utilizada foi de 60 µm.

4.1 Responsividade das Vias Aéreas

Os grupos sensibilizados e expostos a OVA apresentaram maior capacidade de responsividade pulmonar.

Verificamos também alterações consideradas altas no Penh Máx dos grupos de animais pré-desmamados (p= 0,023) e de animais jovens (p = 0,046). Já em relação à sensibilidade de dose de Mch, em nossa análise identificamos valores do ED50 estatisticamente elevados nos grupos de animais jovens e adultos (40D p= 0,05 e 100D p = 0, 014). Não observamos diferença estatística quando comparamos os grupos sensibilizados e expostos a OVA em relação ao Penh Max e ED50. (Figura 3).

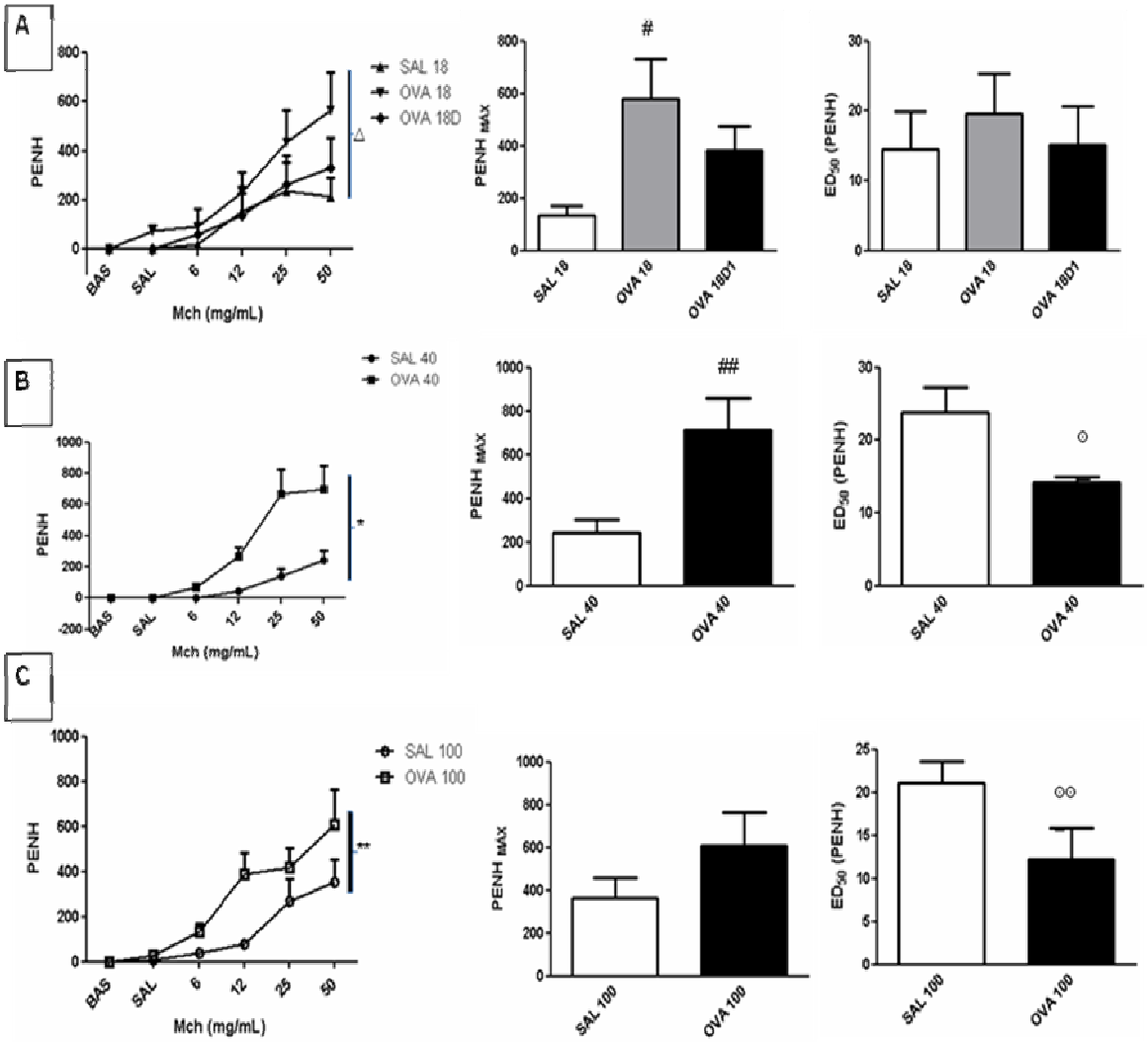


Figura 3. Trata do efeito da sensibilização alérgica na responsividade pulmonar de camundongos com diferentes idades, sendo. **A:** Camundongos pré-desmamados sensibilizados e expostos com um ou dois desafios inalatórios de OVA comparado a seu grupo controle; **B:** Camundongos Jovens sensibilizados e expostos a OVA comparado a seu grupo controle; **C**: Camundongos Adultos sensibilizados e expostos a OVA comparado a seu grupo controle). Valores expressos em PENH, PENH MAX e ED50. **BAS**: basal, **SAL**: salina, 6 a 50: concentrações crescentes de Mch (mg/ml). (PENH - & p=0,002 (saline dose); *p=0,017 and ** p=0,036; PENH MAX - # p=0,023 and ## p= 0,046; ED50 – (□) p= 0,050 and (□ □) p= 0,014).

4.2 Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) para IgE e IgG1-OVA específica

Os títulos de PCA para IgE e IgG1 apresentaram elevados índices em todos os quatro grupos experimentais sensibilizados e expostos a OVA, quando comparados aos respectivos controles. Os camundongos também passaram a produzir maiores títulos de anticorpos a partir do grupo de animais jovens (40D) até os adultos (100D). (Tabela 2)

Tabela 2. Produção de anticorpos anafilático em camundongos sensibilizados com OVA.

Grupo Sensibilizado com OVA	IgE	IgG1	Controle IgE	Controle IgG1
18 D	1:20	1:25	1:5	1:5
18 D1	1:20	1:25	1:5	1:5
40 D	1:160	1:160	1:5	1:5
100 D	1:320	1:640	1:5	1:5

Títulos de IgE e IgG1 foram obtidos por PCA em ratos e camundongos, respectivamente, sensibilizado com plasma de camundongos imunizados e desafiados com OVA. A maior diluição de plasma individual que induziu uma reação positiva em dois testes repetidos representa a titulação de PCA nos camundongos. Os resultados são representativos e com a diferença de no mínimo duas diluições.

4.3 Inflamação

Observamos que todos os grupos sensibilizados a OVA tiveram um aumento significativo na densidade de eosinófilos e células TCD3+, quando comparados ao seu respectivo grupo controle, independentemente da idade, sendo o eosinófilos $p = 0,003$ e as células TCD3+ $p = 0,008$. Não foram encontradas diferenças significativas na densidade celular dos eosinófilos e células TCD3+ entre os grupos controles (eosinófilos -$p = 0,097$ e células TCD3+ $p = 0,339$) (Figura 4).

Quando comparamos entre si os grupos de animais sensibilizados e expostos a OVA, também não identificamos diferença estatística em relação à densidade de células de eosinófilos, com p = 0,052 (Figura 4).

Já em relação à densidade de células TCD3+, foi possível observar maior densidade celular nos grupos sensibilizados com OVA de animais adultos e pré-desmamados com dois desafios, em relação aos grupos pré-desmamados com um desafio e o grupo de animais jovens (p = 0,000); não havendo diferença entre os demais grupos (p = 1,000) (Figura 4).

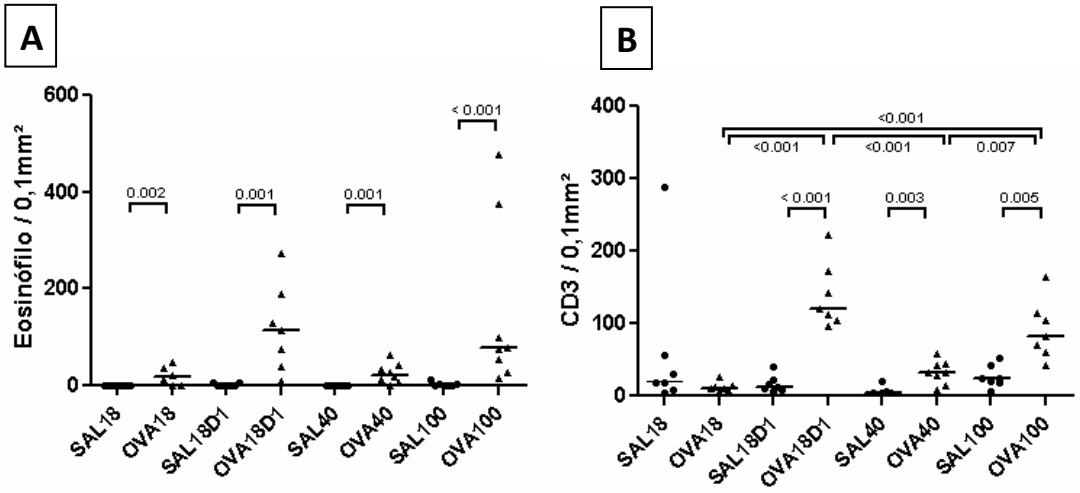


Figura 4. Os gráficos mostram presença de inflamação brônquica. **A –** Inflamação eosinofílica nas vias aéreas em diferentes grupos de estudo, os resultados foram expressos como eosinófilos (coloração Luna) por área (0,1mm^2); **B –** Inflamação linfocítica nas vias aéreas - T CD3+ em diferentes grupos de estudo, os resultados foram expressos como T CD3+ por área (0,1mm^2).

4.4 IL-5 e TGF-β

Neste teste, ao comparamos os grupos OVA com seus respectivos controles, observamos que os grupos de camundongos pré-desmamados com um e com dois desafios apresentaram maior expressão de IL-5 nas vias aéreas ($p = 0,017$), mas não havendo diferenças significativa nos grupos de animais jovens e adultos. Entre os grupos controles, a expressão de IL-5 foi menor nos grupos de camundongos pré-desmamados com um e com dois desafios em relação aos grupos de animais jovens e adultos ($p<0,001$) (Figura 5).

Entre os grupos OVA não houve diferença estatística em relação à expressão de TGF-β ($p = 0,14$). Porém, foi verificado que o grupo de camundongos pré desmamados com um desafio e o grupo de camundongos adultos apresentaram aumento da expressão de TGF-β em suas vias aéreas (18D $p = 0,003$ e 100D $p = 0,006$), isto quando comparados a seu respectivo controle, o que não foi observado nos grupos de camundongos pré-desmamados com dois desafios e no grupo de animais jovem. Vale ainda dizer que não houve diferenças significativas na expressão de TGF-β, quando comparamos os grupos controle entre si ($p = 0,098$), conforme quadro a seguir (Figura 5):

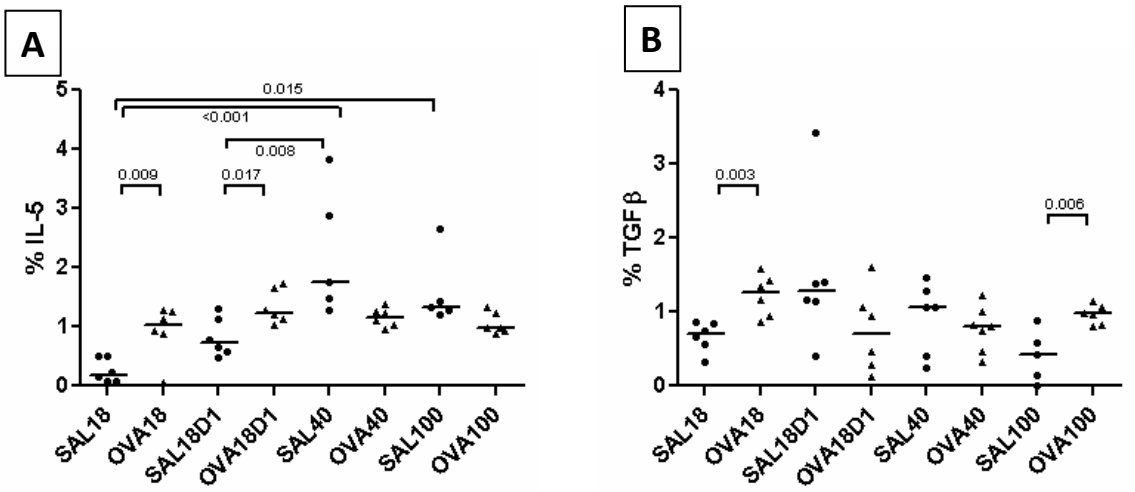


Figura 5. Os gráficos mostram o efeito da sensibilização alérgica em camundongos com diferentes idades. (A) Indica a expressão de IL-5 nas vias aéreas de diferentes grupos de estudo, sendo os resultados expressos em percentagem de área de IL-5 (μm²), dividido pela área total das vias aéreas (μm²); e (B) indica a expressão de TGF-β nas vias aéreas de diferentes grupos de estudo, com os resultados expressos em percentagem de área de TGF-β (μm²), dividido pela área total das vias aéreas (μm²).

4.5 Hiperplasia da Células Caliciformes

Neste caso, houve um aumento estatisticamente significativo na proporção da área epitelial corada por PAS/AB, em todos os grupos sensibilizados e expostos a OVA, quando comparados com seus respectivos controles (p = 0,004); e não havendo diferença quando comparamos os grupos controles entre si (p = 0,704). Os grupos de animais pré-desmamados com um e com dois desafios apresentaram maior proporção da área epitelial corada por PAS/AB, quando comparado aos grupos de animais jovens e adultos (p = 0,007) (Figura 6).

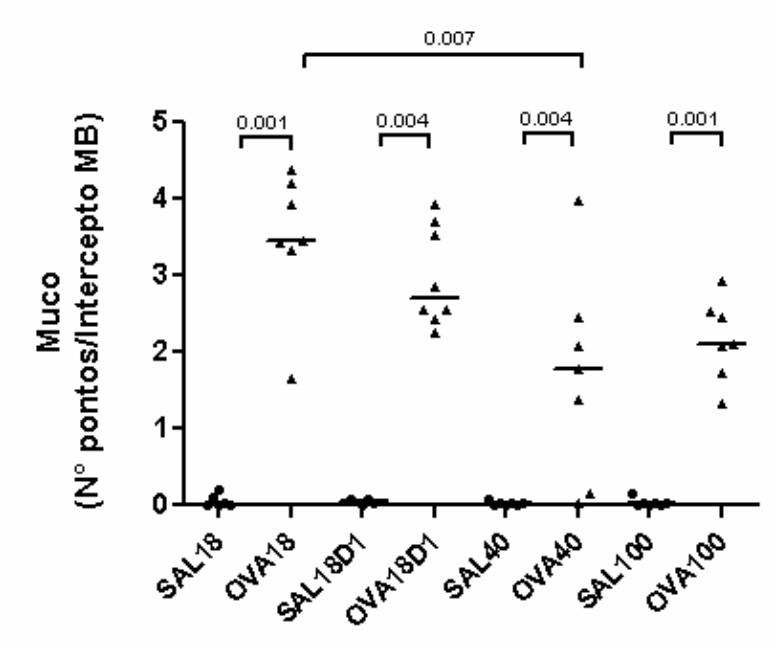


Figura 6. O gráfico mostra o efeito da sensibilização alérgica em camundongos com diferentes idades quanto á área corada por PAS/AB no epitélio brônquico. Os resultados foram expressos como n° pontos sob a área epitelial corada por PAS/AB por intercepto de BM (n°pontos/Intercepto de MB).

4.6 Fibras de Colágeno

Entre os grupos controles, houve um aumento da área fracional de colágeno nos animais pré-desmamados, comparados aos animais adultos ($p < 0,001$), não havendo diferenças com os demais grupos.

Observamos também que todos os grupos sensibilizados com OVA, apresentaram fração maior de área de colágeno, quando comparados a seu respectivo grupo controle ($p = 0,037$), exceção feita ao grupo de animais jovens ($p = 0,336$). Entre os grupos OVA, os animais pré-desmamados com um desafio apresentaram fração menor de área de colágeno, ao

compararmos com o grupo de animais pré-desmamados que receberam dois desafios (p < 0,001). Por fim, vale dizer que não encontramos outras diferenças entre os grupos, conforme se depreende da Figura 7:

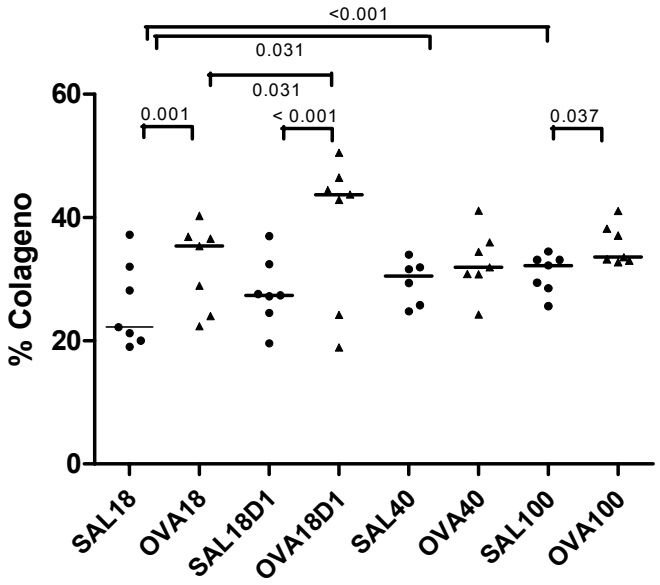


Figura 7. O gráfico mostra o efeito da sensibilização alérgica em camundongos com diferentes idades quanto ao conteúdo de área fracional de colágeno nas vias aéreas. Os resultados foram expressos em porcentagem de área de colágeno (μm²) dividido pela área total das vias aéreas (μm²).

4.7 Músculo Liso da Via Aérea

O grupo de animais pré desmamados com dois desafios apresentaram a maior espessura de músculo liso das vias aéreas superiores com p = 0,006. Comparando os grupos de animais sensibilizados e expostos a OVA, o grupo de animal pré-desmamados com dois desafios novamente apresentou uma espessa MLB, ou seja, maior que dos demais grupos (p<0,001). Todavia, quando o comparamos com seu respectivo controle, não

observamos diferença estatisticamente significativa (p=0,848). Já em relação aos grupos de animais jovens e adultos, quando comparamos o grupo OVA com seu controle, observamos um aumento de espessura do MLB, provavelmente relacionado à idade (p=0,048). Para fins de ilustração da pesquisa, apresentamos a Figura 8:

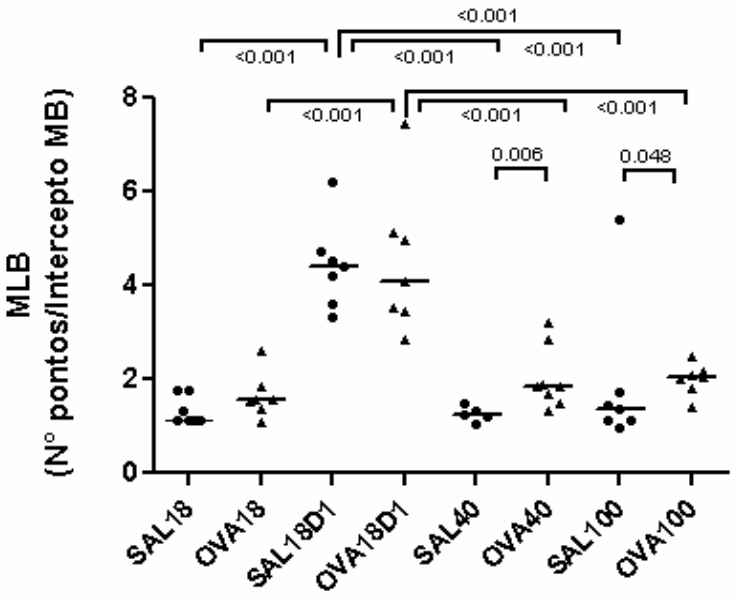


Figura 8. O gráfico mostra o efeito da sensibilização alérgica em camundongos com diferentes idades quanto ao conteúdo de MLB na via aérea de diferentes grupos de estudo. Os resultados foram expressos como n° de pontos sob conteúdo de MLB na via aérea por intercepto de BM (n°pontos/Intercepto de MB).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, comparamos os parâmetros inflamatórios e de remodelamento brônquico em camundongos pré-desmamados, jovens e adultos, submetidos à semelhante protocolo de sensibilização alérgica. Nossos dados mostram que os camundongos pré-desmamados são capazes de desenvolver precocemente alterações inflamatórias e estruturais nas vias aéreas; e que estas alterações apresentam algumas diferenças nos compartimentos envolvidos, especialmente quando comparados aos camundongos jovens e adultos. Além disso, a magnitude dos parâmetros inflamatórios e de remodelamento das vias aéreas nos camundongos pré-desmamados sugerem que o seu aumento pode estar relacionado à frequência de exposição ao alérgeno.

Nesse ponto, vale dizer que, recentemente, pesquisadores voltaram sua atenção para o desenvolvimento do processo inflamatório e do remodelamento das vias aéreas em crianças asmáticas (Saglani et al., 2005; Ohki et al., 2005; Mayuzumi et al., 2007; Bush, 2008a e b; Saglani et al., 2009).

Assim, a utilização segura do exame de broncoscopia, a fim de obter biópsias brônquicas, elucidou alguns dos diversos fenômenos que ocorrem na asma infantil. Estes estudos têm mostrado também que a inflamação e o remodelamento das vias aéreas podem ocorrer em crianças sibilantes persistentes na idade pré-escolar (Bush, 2008b).

Já em crianças com asma grave, o espessamento da membrana basal pode estar presente, independentemente das alterações advindas da inflamação brônquica; e que estas alterações estruturais das vias aéreas parecem ser de magnitude semelhante às que ocorrem no asmático adulto (Jenkins et al., 2003; Saglani et al., 2005; Mauad et al., 2007).

Outrossim, poucos são os estudos que utilizaram modelos experimentais de sensibilização alérgica em camundongos neonatais / infantis. Os estudos disponíveis, assim como o nosso, têm demonstrado que é possível o desenvolvimento de tais modelos com sensibilização sistêmica e/ou local (Ohki et al., 2005; Mayuzumi et al., 2007; Saglani et al., 2009). Assim, para a realização deste estudo, nos baseamos em um modelo experimental desenvolvido por Hamada et al., (1999), igualmente utilizando sua descrição de métodos funcionais e inflamatórios, outrora observados em camundongos jovens.

Ao que tudo indica, o desenvolvimento da asma parece estar relacionado com a reexposição de crianças já sensibilizadas a alérgenos (Sly, 2006).

Assim, analisando os camundongos pré-desmamados, sensibilizados e submetidos a um ou dois desafios com alérgenos, identificamos uma aparente semelhança com a asma em crianças que são expostas a alérgenos, posto que aqueles camundongos pré-desmamados com dois desafios apresentaram maior inflamação linfocítica e maior conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas, especialmente quando comparados aos camundongos pré-desmamados que receberam um único desafio.

Os dados sugerem que o desenvolvimento da inflamação e do remodelamento da via aérea está relacionado a maiores riscos de sensibilização e exposição à alérgenos no início da vida.

Os camundongos pré-desmamados apresentaram maiores níveis de expressão de IL-5, quando comparados aos respectivos controles, bem como a ausência desta diferença entre os animais jovens e adultos. Esse achado reforça a idéia de que uma resposta imune Th2 polarizada a alérgenos e a vírus prevalece em idades jovens (Holt et al., 2005).

Nossos resultados sugerem que o desenvolvimento de alterações estruturais das vias aéreas pode variar de acordo com a idade de sensibilização. Para tanto, verificamos que com um número similar de desafios, os camundongos pré-desmamados desenvolveram intensa metaplasia de células caliciformes, apesar de não haver um aumento da massa muscular MLB, quando comparados aos seus respectivos grupos controles. Sabe-se também que a hipersecreção de muco é um sintoma para várias doenças pulmonares em crianças, principalmente o vírus sincicial respiratório e a bronquiolite (Duncan, 2003; Wang et al., 2003; Ohki et al., 2005). Portanto, o presente estado apóia a idéia de que a regulação da metaplasia de células caliciformes pode ser um alvo interessante na terapêutica de jovens e crianças com asma (Bush, 2008b).

Há evidencias em nossos dados, que não apenas a idade de sensibilização é importante para o desenvolvimento de alterações estruturais, mas também o período de exposição à alérgenos, após a sensibilização. Camundongos pré-desmamados sensibilizados e expostos a

OVA, apresentaram diferentes alterações estruturais, quando comparados aos animais jovens, apresentando alguns parâmetros de distância, como o aumento do conteúdo de fibras de colágeno e a hiperplasia das células caliciformes, mesmo tendo sido sensibilizados com a mesma idade.

No entanto, não houve diferenças na expressão de proteínas TGF-β entre os grupos; e essas mudanças tendem a ser relacionados à maturidade do sistema imunológico nos animais com maior idade.

As alterações estruturais no MLB na asma são consideradas de suma importância para a patogênese da doença, inclusive para associá-la à asma grave (Tillie-Leblond et al., 2008). Sabe-se também que o aumento da espessura da MLB evidencia o estreitamento das vias aéreas em episódios de broncoconstrição excessiva, levando a alterações de distensibilidade e redução do calibre das vias aéreas, podendo prejudicar a capacidade pulmonar total (Jenkins et al., 2003). De nosso conhecimento e este estudo é um dos primeiros a analisar o MLB em um modelo experimental com camundongos pré-desmamados; e nossos dados demonstram que o MLB aumentou somente nos grupos de camundongos jovens e adultos, apesar de similar protocolo de exposição.

Também não encontramos na literatura qualquer informação sobre o início das mudanças estruturais da musculatura lisa brônquica nos seres humanos, bem como qualquer correlação, seja positiva ou negativa, entre as alterações do MLB e a inflamação alérgica.

Ressaltamos que a limitação dos modelos experimentais de sensibilização alérgica para asma, não permitiram uma comparação de

todos os fenômenos, induzidos por mecanismos alérgicos com a asma humana, especialmente a asma grave por frequentemente não ser de cunho atópico.

Vale esclarecer que estudos anteriores em crianças asmáticas, com aproximadamente 11 anos de idade, mostraram aumento da MLB em relação aos controles, com uma proporção similar de MLB nas vias aéreas já descritas em adultos (Regamey et al., 2008). Outro estudo em crianças com asma grave (idades entre 6-14 anos), evidenciou um aumento de MLB no grupo de crianças que apresentavam obstrução persistente de ar, assim como maior expressão de proteínas de marcadores de contratilidade muscular. Contudo, não houve diferença em relação aos níveis de eosinófilos / TCD3+ ou espessura da membrana basal (Tillie-Leblond et al., 2008) em comparação a seus controles. Esses dados apenas reforçam a importância de se observar as alterações do MLB, no intuito de verificar a gravidade da doença, gerindo a necessidade de uma conduta terapêutica que vise o MLB na asma.

Portanto, os dados aqui apresentados possuem uma pequena semelhança com a asma em crianças, de modo que as informações aqui geradas podem ser o ponto de partida para outros estudos da asma, principalmente na idade mais jovem, onde há espaço para impedir e ou prevenir algumas alterações estruturais das vias aéreas.

Em resumo, mostramos que os camundongos pré-desmamados com dois desafios, apresentaram maior inflamação linfocítica, hiperplasia de

células caliciformes e maior conteúdo de fibras colágenas nas vias aéreas, de modo que o desenvolvimento de alterações inflamatórias e estruturais nas vias aéreas é diferente quando comparados as alterações observadas em animais com maior idade.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido um modelo de sensibilização alérgica em camundongos pré desmamados, jovens e adultos;
- Animais pré-desmamados sensibilizados e expostos a OVA apresentaram hiperresponsividade das vias aéreas, assim como os animais jovens e adultos;
- Houve aumento significativo na densidade de eosinófilos e linfócitos em todos os grupos de animais sensibilizados e expostos a OVA;
- Houve um aumento da densidade de linfócitos TCD3+ quando comparamos o grupo de animais pré-desmamados com dois desafios com os animais jovens
- Camundongos pré-desmamados sensibilizados e expostos a OVA não apresentaram maior expressão de IL-5 e de TGF-β quando comparamos com os camundongos jovens e adultos;
- Animais pré-desmamados com um e dois desafios apresentaram maior expressão de muco quando comparados aos animais jovens e adultos e maior conteúdo de fibras colágenas quando comparados somente aos animais adultos;
- Não foi observado fração maior de área de colágeno no grupo de animais jovens;
- A MLB do grupo sensibilizado e exposto a OVA de animais pré-desmamados com dois desafios apresentou maior espessura quando

comparado aos animais jovens e adultos, todavia quando o comparamos com seu respectivo controle, não observamos diferença;

- Já os grupos de animais jovens e adultos, quando comparamos o grupo OVA com seu controle, houve aumento de espessura MLB;

ANEXO

7 Anexo

Anexo 1 – Aprovação de Comissão de Ética para análise de Pesquisa (CAPPesq)

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1253/05**, intitulado: **"Análise das repercussões anátomo-funcionais no sistema respiratório e mecânica pulmonar de camundongos jovens sensibilizados e expostos à residual OIL FLY ASH."** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Thais Mauad**
Pesquisador (a) Executante: **Sra. Denise Simão Carnieli**

CAPPesq, 08 de fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05403 010 – São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br
VCN

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ref: carta datada de 28.11.06

Ao
Departamento de Patologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.06.07, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **1253/03** Intitulado: **Análise das repercurssões anátomo-funcionais no sistema respiratório e mecânica pulmonar de camundongos jovens sensibilizados e expostos à residual oil fly ash**", terá seu título modificado para "Análise das repercurssões anátomo-funcionais no sistema respiratório de camundongos jovens sensibilizados e expostos a partículas de exaustão de particulado de diesel"

CAPPesq, 20 de junho de 2007

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
tms

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler A, Cieslewicz G, Irvin CG. Unrestrained plethysmography is an unreliable measure of airway responsiveness in BALB/c and C57BL/ 6 mice. *J Appl Physiol* 2004;97:286-92.

Asma Brônquica/Asma na Infância. 2008. Brasil. Acessado em 08 maio de 2008 [Disponível em http://www.asmabronquica.com.br/medical/asma_infancia.html]

Balzar S, Wenzel SE, Chu HW. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. *Eur Respir J*. 2002; 20:254-59.

Begueret H, Berger P, Vernejoux JM, Dubuisson L, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax*. 2007; 62:8-15.

Berhane K, McConnell R, Gilliland F, Islam T, Gauderman WJ, Avol E, London SJ, Rappaport E, Margolis HG, Peters JM. Sex-specific effects of asthma on pulmonary function in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1723-30.

Bush A. How early do airway inflammation and remodeling occur? *Allergol Int* 2008a;57:11-9.

Bush A. Update in pediatric lung disease 2007. *Am J Respir Crit Care Med* 2008b;177:686-95.

Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CR, Twentyman OP, Howarth RH, Holgate ST. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-57.

Duncan FR. Pulmonary mucus: pediatric perspective. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:178-88.

Gelfand EW. Is asthma in childhood different from asthma in adults? Why do we need special approaches to asthma in children? *Allergy Asthma Proc* 2008;29:99-102.

GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed. 2006. Reino Unido. Disponível em: http:// www.ginasthma.org. [Acessado em 15 setembro de 2009]

Hamada K, Goldsmith CA, Kobzik L. Increased airway hyperresponsiveness and inflammation in a juvenile mouse model of asthma exposed to air-pollutant aerosol. *J Toxicol Environ Health A* 1999;58:129-43.

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:766-75.

Hargreave FE, Nair P. The definition and diagnosis of asthma. Clin Exp Allergy 2009;39:1652-8

Horner CC, Strunk RC. Age-related changes in the asthmatic phenotype in children. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:295-9.

Jenkins HA, Cool C, Szefler SJ, Covar R, Brugman S, Gelfand EW, Spahn JD. Histopathology of severe childhood asthma: a case series. *Ches*t 2003;124:32-41.

Johnson SR, Knox AR. Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends Phamacol Sci.* 1997;18:288-92.

Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airflow mucosal inflammation even in patients whith newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147:697-704.

Lancas T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006;100:1610-6.

Lomask M. Further exploration of the penh parameter. *Exp Toxicol Pathol* 2006;57:13-20.

Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma terapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:997-1009.

Mayuzumi H, Ohki Y, Tokuyama K, Sato A, Mizuno T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Age-related difference in the persistency of allergic airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143:255-62.

Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1253-8.

Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. *Life Sciences* 1970;9:923-30.

Ohki Y, Tokuyama K, Mayuzumi H, Sato A, Koyama H, Takizawa T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Characteristic features of allergic airway inflammation in a murine model of infantile asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138:51-8.

Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis. *Methods Med Res* 1964;10:158-62.

Payne DNR, Rogers AV, Delroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:78-82.

Pearce N, Aït-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C; and the ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC). *Thorax* 2007; 62:758-66.

Regamey N, Ochs M, Hilliard TN, Mühlfeld C, Cornish N, Fleming L, Saglani S, Alton EW, Bush A, Jeffery PK, Davies JC. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:837-43.

Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, Malmberg LP, Lindahl H, Kajosaari M, Turpeinen M, Rogers AV, Payne DN, Bush A, Haahtela T, Mäkelä MJ, Jeffery PK. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:722-7.

Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, Jeffery PK. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:858-64.

Saglani S, Mathie SA, Gregory LG, Bell MJ, Bush A, Lloyd CM. Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite exposed neonatal Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:281-9.

Sears MR, Greene JM, Willan AR, Wiecek EM, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, Herbison GP, Silva PA, Poulton R. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. *N Engl J Med* 2003;349:1414-22.

Shin YS, Takeda K, Gelfand WE. Understanding asthma using animal models. *Allergy Asthma Immunol Res* 2009;1:10-8.

Singh B, Shinagawa K, Taube C, Gelfand EW, Pabst R. Strain-specific differences in perivascular inflammation in lungs in two murine models of allergic airway inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005;141:223-9.

Sly PD. Objective assessment of lung disease in wheezy infants: the time has come. *Pediatr Pulmonol* 2006;41:798-800.

Sly PD, Zosky GR. Animal models of asthma. *Clin Exper Allergy*. 2007;37:973-88.

Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. ISAAC - Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. *J Pediatr (RJ)* 2006;82:341-6.

Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med*. 1998; 188:2019-31

Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 1999;162:6284-93.

Takeda K, Gelfand EW. Mouse models of allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 2009;21:660-5.

Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. *Allergy* 2008;63:533-41.

Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target. Roger S. Michell lecture. *Chest.* 2003; 123:348-55.

Vieira RP. *Efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.

Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, Mauad T, Martins MA, Dolhnikoff M, Carvalho CR. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:871-877.

Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod KS. Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 2003;171:1051-60.

Warman KL, Silver EJ, Stein RE. Asthma symptoms, morbidity, and antiinflammatory use in inner-city children. *Pediatrics* 2001;108:277-82.

Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Pincanço MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LFF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:829-37.

Zar JH. *Biostatistical analysis*. 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1984. p.206-35.

APÊNDICE

Pediatric Pulmonology

INFLAMMATION AND REMODELING IN INFANTILE, JUVENILE AND ADULT ALLERGIC SENSITIZED MICE

Journal:	*Pediatric Pulmonology*
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Carnieli, Denise; Sao Paulo University Medical School, Pathology Yoshioka, Eliane; Sao Paulo University Medical School, Pathology da Silva, Luiz; Sao Paulo University Medical School, Pathology Lancas, Tatiana; Sao Paulo University Medical School, Pathology Arantes, Fernanda; Sao Paulo University Medical School, Pathology Perini, Adenir; Sao Paulo University Medical School, Pathology Martins, Milton; School of Medicine, University of Sao Paulo, Medicine Saldiva, Paulo; Experimental Air Pollution Laboratory, Department of Pathology, Medical School, University of São Paulo Dolhnikoff, Marisa; Sao Paulo University Medical School, Pathology Mauad, Thais; Sao Paulo University Medical School, Pathology
Keywords:	asthma, neonatal, mice, inflammation, remodeling, allergic sensitization

John Wiley & Sons, Inc.

A**pêndice 1** - Artigo submetido

INFLAMMATION AND REMODELING IN INFANTILE, JUVENILE AND ADULT ALLERGIC SENSITIZED MICE

Denise S. Carnieli [(1)], Eliane Yoshioka [(1)], Luis Fernando Ferraz da Silva [(1)], Tatiana Lanças [(1)], Fernanda M. Arantes [(2)], Adenir Perini [(2)], Milton A. Martins [(2)], Paulo Hilário Nascimento Saldiva [(1)], Marisa Dolhnikoff [(1)], Thais Mauad [(1)]

Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM05), Department of Pathology)[1] and Laboratory of Therapeutic Experimental (LIM20), Department of Internal Medicine, [2], School of Medicine, São Paulo University, São Paulo, Brazil

Address for correspondence and request for reprints to:

Thais Mauad, MD, PhD

São Paulo University Medical School

Av. Dr. Arnaldo, 455 – 1º andar – room 1155

01246-903 – São Paulo – SP – Brazil

Phone: 55-11-30617173

Fax: 55-11-30628098

E-mail: tmauad@usp.br

Supported by: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ABSTRACT

Airway structural changes occur early in childhood asthma, but it is unknown whether the development of airway alterations in children is similar to that of adults. We compared inflammation and remodeling parameters in allergic sensitized infantile, juvenile and adult mice. **Methods:** Infantile mice (18D) were sensitized with 3 intraperitoneal injections (i.p.) of 10 µg ovalbumin (OVA) at days 5 and 7 and with 3 daily inhalations of 3% OVA at days 14-16. The 18D1 group received an additional challenge at days 9-11 The juvenile mice (40D) received challenges at days 22-24 and 36-38. Adult mice (100D) were sensitized at days 60-62 and received 3 daily inhalations at days 77-79 and 96-98. **Results:** There were no differences in eosinophil density (p= 0.052) among the sensitized animals. The density of CD3+ T cells was higher in the 100D and 18D1 groups than in the 18D and 40D groups (p<0.001). Infantile sensitized groups demonstrated increased interleukin-5 expression in the airways (p=0.017). There were no differences in transforming growth factor-β expression among the OVA-sensitized groups. Infantile mice demonstrated more mucus in the bronchiolar epithelium than the 40D and 100D mice (p=0.007 and p=0.073, respectively). The 18D animals demonstrated less collagen than the 18D1 group (p<0.001). Juvenile and adult mice had increased airway smooth muscle thickness when compared to age-matched controls, but no differences were observed in the infantile groups (p=0.048). **Conclusion:** We have shown that infantile mice develop inflammatory and structural alterations in the airways that are partially different from those developed in older animals. **Keywords:** Asthma • Mice BALB/c • Pulmonary inflammation • Airwayremodeling.

INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the lungs that involves complex interactions between mast cells, eosinophils, T-lymphocytes, epithelial cells, and cellular mediators. The inflammation and structural changes in the airways that occur in asthma are believed to contribute to the development of airway obstruction and increased bronchial hyperresponsiveness to a variety of stimuli[1,2].

The prevalence of childhood asthma is high worldwide. Data from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) phase three study indicate that the worldwide prevalence of current wheeze is 11.5% in 6- to 7-year-old children and 14.1% in adolescents, displaying wide geographical variations. The prevalence of severe asthma is 4.9% and 6.9% in younger children and adolescents, respectively[3].

Phenotypically, pediatric and adult asthma seem to differ. In adult-onset asthma, symptoms tend to be persistent and more severe, and many patients are not atopic. In children, asthma has a more episodic character and is usually related to atopy[4]. Clinical symptoms frequently remit during adolescence. However, it has been shown that childhood asthma may relapse in later adulthood, and the more severe the symptoms are in childhood, the greater the chances of relapse[5]. In addition, even in asthmatic adolescents without symptoms, there are signs of persistent inflammation and lung function abnormalities such as hyperinflation and increased residual volume[6,7,8].

These findings are in accordance with pathological findings in biopsies of asthmatic children that show early findings of structural abnormalities, such as the thickening of the reticular basement membrane (RBM) and increased airway smooth muscle (ASM) mass[9,10]. These alterations seem to be absent in wheezing infants[11] but may be present already in children at the age of three[12]. In children with severe asthma, the amount of airway smooth muscle mass, but not the reticular RBM thickening, correlates with signs of bronchial obstruction[10].

Recently, mice models of infantile/juvenile allergic sensitization have been described[13,14,15,16]. These studies using sensitized young mice were able to show features of airway allergic inflammation similar to the observed in adult mice. In addition, some authors demonstrated that the young animals develop signs of airway remodeling in parallel with inflammation[13].

We hypothesized that inflammation and structural alterations would be different in adult sensitized mice when compared to younger sensitized mice. Such differences could be related to the differences of the immune responses between young and adult animals and to the phenotypic differences observed in pediatric versus adult asthma. Few studies have compared the development and magnitude of airway allergic inflammation and remodeling in mice of different ages[14,15].

Therefore, our aim in this study was to compare the features of allergic inflammation and remodeling in allergen-sensitized animals of different ages: infantile, juvenile and adult mice.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the institutional review board.

Animals

All animals received humane care in compliance with the "Principles of Laboratory Animal Care" published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23, revised 1985). Animals were fed *ad libitum* with water and commercial pelleted food for small rodents from Nuvital (Nuvilab CR-1, Colombo, Pr, Brazil).

Sensitization and challenge protocols

Infant and juvenile mice

Female BALB/c mice and their 3-day-old pups were obtained from the animal facility core of the Sao Paulo University Medical School. Each mother and her litter were housed separately. At 5 days of age, pups were immunized intraperitoneally (i.p.) with 10 μg of ovalbumin (OVA) (Advanced Nutrition, Rio de Janeiro, Brazil) in 1 mg of alum ($AlOH_3$) in 0.1 ml saline (0.9% NaCl), and they received an OVA boost at day 7. Animals were then divided into three groups: one group was challenged with aerosolized 3% OVA solution using an ultrasonic nebulizer (Pulmoclear II Luxo – Soniclear, São Paulo, Brazil) for 10 minutes a day for 3 consecutive days from day 14 to 16. These animals were euthanized on day 18. The second group received challenges on days 9 to 11 and days 14 to 16 and was euthanized on day 18. A third group received challenges on days 21 to 23 and days 36 to 38 and was euthanized on day 40.

Adult mice

Sixty-day-old BALB/c mice (day 60) were immunized i.p with 10 μg OVA in 1 mg of alum in 0.1 ml saline, and they received a boost on day 62. Animals were then challenged with aerosolized 3% OVA solution using an ultrasonic nebulizer for 10 minutes a day for 3 consecutive days from days 76 to 78 and days 96 to 98. These animals were euthanized on day 100.

The control groups received i.p. immunization with alum alone and challenges with vehicle (saline) under the same protocols for infantile, juvenile and adult mice. The number of animals in each group was six to eight. The study design is depicted in Figure 1.

Measurement of airway hyperresponsiveness

Pulmonary responsiveness of mice to increasing concentrations of aerosolized methacholine (Mch) was measured through a whole-body plethysmography system (BUXCO, Winchester, UK). Briefly, each mouse was placed in a chamber, and the box pressure-time wave was continuously measured via a transducer connected to a computer data- acquisition system. The main indicator of air bronchoconstriction, enhanced pause (Penh), which shows a correlation with airway resistance measured according to standard evaluation methods in BALB/c mice[17], was calculated from the box pressure-time wave form[18]. After measurement of the baseline Penh, either aerosolized saline or Mch in increasing concentrations (6, 12, 25, 50 mg/ml) was nebulized through an inlet of the chamber for 3 min. Penh

values for each dose were collected for 5 min and averaged. Results were expressed as Penh values, Penh Max values and effective dose (ED50).

Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) to IgE and OVA-specific IgG$_1$

A PCA reaction was employed for detecting and estimating IgE and OVA-specific IgG1 antibodies as previously described[19,20]. Briefly, the backs of naive rats were shaved, and several 0.1 ml intradermal injections of antiserum dilutions submitted to the different protocols of immunization were made. After a latent period of 24 h for IgE, these animals were injected intravenously (i.v.) with 1 ml of a 0.5% solution of Evans blue in saline (0.9% NaCl) containing 1 mg of antigen. Thirty minutes after antigen injection, the animals were euthanized, and the diameters of the blue spots on the inner surface of the flayed skin were measured.

To detect IgG1 antibody, the anti-sera were heated for 1 h at 56ºC to destroy the PCA activity due to IgE. Briefly, the backs of the naive mice were shaved, and several 0.05 ml intradermal injections of antiserum dilutions submitted to the different protocols of immunization were made. After a latent period of 2 hours, the animals were injected i.v. with 0.5 ml of a 0.5% solution of Evans blue in saline (0.9% NaCl) containing 1 mg of antigen. Thirty minutes after antigen injection, the animals were euthanized, and the diameters of the blue spots on the inner surface of the flayed skin were measured.

The PCA titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution that produced a lesion of more than 5 mm in diameter in duplicate tests. The detection threshold was established at 1:5 dilutions to avoid positive reaction due to non-specific degranulation of mast cells.

Tissue preparation

Animals were euthanized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight, i.p.). Lungs were fixed by intratracheal instillation of formalin (4% formaldehyde in 2% buffer) for 24 h and were then paraffin embedded. Transversally cut lung tissue specimens were cut into 5-μm thick sections and prepared for immunohistochemical and histochemical analysis.

Histochemistry

Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), PAS-Alcian blue, Masson´s trichrome, Sirius red (collagen) and Luna staining (eosinophils)[21].

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using the polyclonal rat antibody to CD3 (1:300, Serotec Inc., Raleigh, NC) and using the polyclonal rabbit antibodies to interleukin 5 (IL-5) (1:800, Santa Cruz Biotechnology, CA) and transforming growth factor-beta (TGF-β) (1:1200, Santa Cruz, CA).

Sections were deparaffinized, and a 0.3% hydrogen peroxide solution was applied for 35 min to inhibit endogenous peroxidase activity. Antigen

retrieval was performed with citrate solution for 45 min. Sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C. The biotin-streptavidin peroxidase method (VECTASTAIN, Irvine, CA) was used as the secondary antibody and 3,3 diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) was used as the chromogen. The sections were counterstained with Harris hematoxylin. For negative controls, the primary antibody was replaced with PBS.

Morphometry

We quantified the bronchial density of eosinophils and CD3+ T cells in the airways using a point-counting technique. Using a 168-point grid with a known area (11,449 μm^2 at a 1000x magnification) attached to the microscope ocular; we counted the number of points hitting airway wall. Counting was performed in 25 fields of airway walls (mean of 5 airways) of each animal, and results were expressed as cells/ μm^2. The ASM thickness and epithelial mucus content were measured by counting the number of points that hit on smooth muscle and on mucus (Masson staining and PAS staining, respectively) divided by the number of intercepts that hit on the basement membrane (number of points/intercept).[22]

Airway collagen content and the expression of TGF-β and IL-5 were obtained by image analysis using the software Image-Pro® Plus 4.5 for Windows® (Media Cybernetics–Silver Spring, MD, USA) on a compatible microcomputer connected to a digital camera and coupled to a light microscope (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany). We

analyzed five airways per animal at a magnification of 400x. The area of positive staining in the peribronchiolar region was determined by color threshold. Results were expressed as percentages [positive area (μm²) divided by total airway area (μm²)].

Statistical analysis

Parametric and non-parametrical data are expressed as means±SD or median/IQR, respectively. The statistical significance between groups was assessed by a t-test or Mann-Whitney U-test. For comparisons in more than two groups, one-way analysis of variance (parametric data) or the Kruskal-Wallis (non-parametric data) test followed by the Bonferroni post-hoc test were used; significance level was adjusted to 5% ($p<0.05$). The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 15.0 for Windows was used for the analysis.

RESULTS

OVA-treated groups showed signs of allergic inflammation with monocytes and eosinophils and increased mucus content in the airways (Figure 2).

Airway responsiveness

OVA exposure induced an increase in lung responsiveness, causing significant changes in Penh Max in the infantile group with one or two challenges (p=0.023) and in juvenile mice (p=0.046). The analysis of the ED50 values showed significantly decreased values in the juvenile (p=0.05) and adult (p=0.014) groups. In the infantile group with one or two challenges, there was a trend towards increased Penh values at the Mch doses of 50 mg/ml (p=0.06). In the juvenile group, there were significant differences at the Mch doses of 12, 25 and 50 mg/ml (p=0.017). In the adult group, differences were observed at the Mch doses of 6 and 12 mg/ml (p=0.036) (Figure 3).

Effects of OVA sensitization at different ages on anaphylactic antibodies IgE and IgG1

The PCA titers of IgG1 and IgE were higher in all four experimental groups when compared to their respective controls. However, PCA titers were higher in the juvenile and adult mice (Table 1).

Inflammation

There were no significant differences in eosinophil and CD3+ T cell densities among controls (eosinophils p=0.097, CD3+T cells p=0.339). In all

OVA groups, there was a significant increase in the density of eosinophils (p=0.002) and CD3+ T cells (p=0.005) when compared to controls irrespective of age. When the OVA-treated animals were compared, there were no differences regarding eosinophil cell density (p=0.052) (Figure 4).

The density of CD3+ T cells was higher in the adult mice and in the infantile group with two challenges when compared to the infantile group with one challenge and the juvenile mice (p<0.001) (Figure 4).

IL-5 and TGF-β

Among controls, IL-5 expression was lower in the infantile group with one challenge in relation to the juvenile and adult mice (p<0.001). When the OVA groups were compared to their respective controls, the infantile groups demonstrated increased IL-5 expression in the airways (p=0.017), but no differences were observed in the juvenile and adult mice. No differences among OVA groups were observed (p=0.14) (Figure 4).

The infantile group (p=0.003) with one challenge and the adult mice (p=0.006) demonstrated increased TGF-β expression in the airways when compared to their respective controls, but no differences were observed in the infantile with two challenges and the juvenile groups. There were no significant differences among controls and among OVA groups (p=0.098) (Figure 4).

Goblet cell hyperplasia

Signs of increased mucus production/accumulation were present in all OVA-treated groups, which differed significantly from controls (p=0.004).

There was no difference among controls (p=0.704). Infantile mice with one or two challenges presented with higher PAS positivity in the bronchiolar epithelium than the juveniles (p=0.007) (Figure 5).

Collagen fraction area

Among controls, there was an increased collagen fraction area in relation to the total airway area in adult mice when compared to infantile mice (p<0.001), but there were no differences among the other groups. All OVA-sensitized groups demonstrated a higher collagen area fraction than their respective control group (p=0.037) with the exception of the juvenile mice (p=0.336). Among the OVA mice, infantile mice with one challenge demonstrated a lower collagen area fraction than the group of infantile mice that received two challenges (p<0.001) without further differences among the groups (Figure 5).

Airway smooth muscle (ASM) thickness

Among controls, the group of infantile mice that received two saline inhalations had greater ASM thickness than the other control animals (p=0.006). Infantile mice sensitized with two challenges had a thicker ASM than other groups (p<0.001); however, when OVA-sensitized animals were compared to their respective controls, infantile mice did not demonstrate significant differences (p=0.848). Juvenile and adult mice had increased ASM thickness when compared to their age-related controls (p=0.048) (Figure 5).

DISCUSSION

In this study, we compared inflammatory and remodeling parameters in infantile, juvenile and adult mice submitted to similar protocols of allergic sensitization. Our data show that sensitized infantile mice develop inflammatory and structural alterations in the airways, which differed from juvenile and adult mice in the airway compartments that are altered. Further, the magnitude of some inflammatory and remodeling parameters in infantile mice seemed to be related to the frequency of allergen exposure.

Much attention has been drawn to the development of inflammation and airway remodeling in asthmatic children. The safe use of bronchoscopy to obtain bronchial biopsies has shed light on several phenomena occurring in childhood asthma. These studies have shown that inflammation and remodeling occur already in persistent wheezers at the pre-school age[12]. In children with severe asthma, thickening of the RBM may occur irrespective of inflammation; importantly, these airway structural changes seem to be of similar magnitude to those occurring in adult asthma [9,23].

Few studies have used models of neonatal/infantile allergic sensitization in mice. The available studies have shown that it is possible to develop such models using both systemic and local sensitization[13,14,15]. We used the model developed by Hamada et al., and, in accordance with their findings, functional and inflammatory features were observed in the younger mice[16].

The development of asthma seems to be related to re-exposure to aeroallergens in sensitized children[24]. In this study, we analyzed sensitized

infantile mice submitted to one or two challenges early in life. Our data show that infantile mice sensitized with two challenges demonstrated a more prominent lymphocytic inflammation than infantile mice with one challenge and displayed higher collagen content in the airways. These data suggest that the development of inflammation and remodeling might be linked to more frequent exposures early in life.

Juvenile and adult saline mice demonstrated higher expression of IL-5 than infant mice in the airways. However, infantile sensitized mice demonstrated higher levels of IL-5 expression when compared to their respective controls, whereas no differences were observed between juveniles and adults when compared to their age-matched controls. This finding supports the idea that a polarized Th2 immune response to allergens prevails at younger ages[25].

Our results suggest that the development of the airway structural alterations may differ according to the age of sensitization. With a similar number of challenges, infantile mice developed intense mucus metaplasia, but there was no increase in ASM mass when compared to their respective controls. Mucus hypersecretion is a symptom of several lung diseases in infants, primarily in bronchiolitis. Our study supports the idea that the regulation of mucus hypersecretion might be a possible therapeutic target in young asthmatic children[26].

Our data also show that both the age of sensitization and the period of allergen exposure after sensitization are important to the development of structural alterations. Juvenile challenged mice presented with different

structural alterations than infantile mice in some parameters, such as increased collagen content and mucus hyperplasia, despite having been sensitized at the same age. However, there were no differences in the protein expression of TGF-β among the groups. These changes are likely to be related to the increased maturation of the immune system in the older animals.

Structural alterations in the ASM in asthma are believed to be pivotal to disease pathogenesis and linked to asthma severity[27]. To our knowledge, this study is the first to analyze ASM mass in an infantile mice model. Our data show that the ASM mass only increased in the juvenile and adult mice groups despite similar challenge protocols. In humans, it is unknown when structural changes in the ASM are initiated. It is also unknown whether they these changes are intrinsic or allergy-related. A limitation of allergic-sensitization models of is that all phenomena are allergy driven, which may not be the case in humans, especially in severe, non-atopic asthma.

Previous studies on asthmatic children aged 11 years showed increased ASM mass in relation to controls; the children displayed an ASM proportion in the airways that was similar to the proportion described in adults[10]. Another study on severe asthmatic children (ages ranging from 6-14 years) compared children with and without persistent air obstruction. Persistently obstructed asthmatic children showed an increase in the ASM mass and a higher protein expression of muscle contractility markers; however, there was no difference between the levels of eosinophils/CD3+ T lymphocytes or the thickness of the basement membrane in the two

groups[27]. These data reinforce the key role of ASM abnormalities in disease severity and the necessity of therapies that target the ASM in asthma. Our results may have important implications, showing that, at a younger age, there may be still be time to prevent some structural airway changes such as increased ASM mass.

This study has several limitations. We used an OVA-induced model via i.p injections instead of sensitization with an aeroallergen that would more naturally mimic childhood asthma. However, with this model, inflammatory and structural abnormalities similar to the house dust model were observed[12]. It is interesting to consider whether adults with late-onset asthma actually have non-diagnosed asthma during childhood that relapsed later in life. The limitations of the allergic sensitization models in mice make a similar study design difficult.

In summary, we have shown that infantile mice develop inflammatory and structural alterations in the airways that are partially different from those developed in older animals. Understanding the phenotypic differences in childhood versus adult asthma is crucial in treating the disease adequately and preventing the escalation of disease severity.

ACKNOWLEDGMENTS

None of the authors has any conflicts of interest with the subject of this manuscript.

REFERENCES

1 GINA – Global Initiative for Asthma [on line]. Ed. 2006. United Kingdom. Accessed April 25, 2010 [Available at http www.ginasthma.org].

2 Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. J. Allergy Clin Immunol 2007;120:997-1009

3 Pearce N, Aït-Khaled N, Beasley R, et al. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC). Thorax 2007;62:758-766.

4 Gelfand EW. Is asthma in childhood different from asthma in adults? Why do we need special approaches to asthma in children? Allergy Asthma Proc 2008;29:99-102.

5 Horner CC, Strunk RC. Age-related changes in the asthmatic phenotype in children. Curr Opin Pediatr 2007;19:295-299.

6 Sears MR, Greene JM, Willan AR, et al. A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. N Engl J Med 2003;349:1414-1422.

7 Berhane K, McConnell R, Gilliland F, et al. Sex-specific effects of asthma on pulmonary function in children. Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1723-1730.

8 Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, et al. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:1253-1258.

9 Payne DNR, Rogers AV, Delroth E, Bandi V, Guntupalli KK, Bush A, Jeffery PK. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:78-82.

10 Regamey N, Ochs M, Hilliard TN, et al. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med 2008;177:837-843.

11 Saglani S, Malmström K, Pelkonen AS, et al. Airway remodeling and inflammation in symptomatic infants with reversible airflow obstruction. Am J Respir Crit Care Med 2005;171:722-727.

12 Saglani S, Payne DN, Zhu J, et al. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:858-864.

13 Saglani S, Mathie SA, Gregory LG, Bell MJ, Bush A, Lloyd CM. Pathophysiological features of asthma develop in parallel in house dust mite exposed neonatal Mice. Am J Respir Cell Mol Biol 2009;41:281-289.

14 Ohki Y, Tokuyama K, Mayuzumi H, et al. Characteristic features of allergic airway inflammation in a murine model of infantile asthma. Int Arch Allergy Immunol 2005;138:51-58.

15 Mayuzumi H, Ohki Y, Tokuyama K, et al. Age-related difference in the persistency of allergic airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. Int Arch Allergy Immunol 2007;143:255-262.

16 Hamada K, Goldsmith CA, Kobzik L. Increased airway hyperresponsiveness and inflammation in a juvenile mouse model of asthma exposed to air-pollutant aerosol. J Toxicol Environ Health A 1999;58:129-143.

17 Lomask M. Further exploration of the Penh parameter. Exp Toxicol Pathol. 2006;57:13-20.

18 Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:766-775.

19 Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis. Methods Med Res 1964;10:158-162.

20 Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. Life Sciences 1970;9:923-930.

21 Lancas T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. J Appl Physiol 2006;100:1610-1616.

22 Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. Am J Respir Crit Care Med 2007;176:871-877.

23 Jenkins HA, Cool C, Szefler SJ, et al. Histopathology of severe childhood asthma: a case series. Chest 2003;124:32-41.

24 Guilbert TW, Morgan WJ, Zeiger RS, et al. Atopic characteristics of children with recurrent wheezing at high risk for the development of childhood asthma. J Allergy Clin Immunol 2004;114:1282-1287.

25 Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: Implications for development of asthma prevention strategies. Allergy Clin Immunol 2005;116:16-24.

26 Duncan FR. Pulmonary mucus: pediatric perspective. Pediatr Pulmonol 2003;36:178-188.

27 Tillie-Leblond I, de Blic J, Jaubert F, Wallaert B, Scheinmann P, Gosset P. Airway remodeling is correlated with obstruction in children with severe asthma. Allergy 2008;63:533-541.

FIGURES LEGENDS

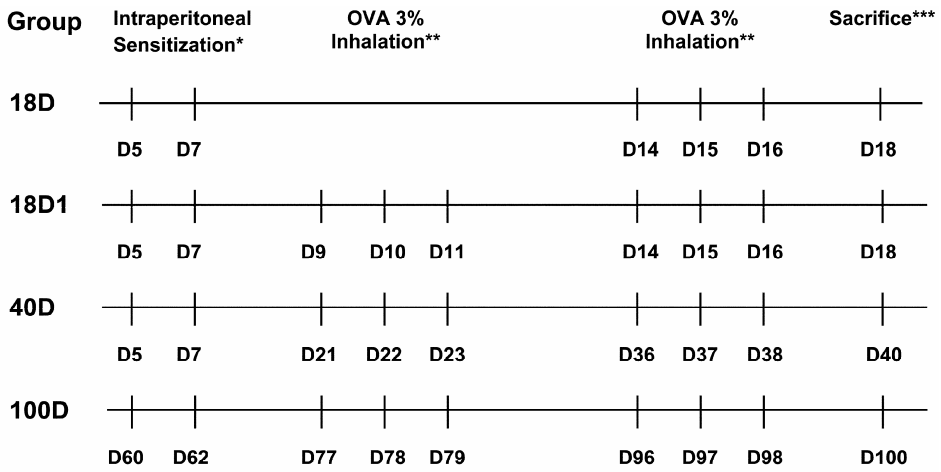
Figure 01 - Study Design.

Figure 02 - The microphotographs show H&E stained sections of mice of different ages. The left panel (A, C, E, G) shows sections of control animals and the right panel shows sections of OVA-sensitized mice (B, D, E, H). Sensitized infantile mice with one challenge (B), infantile mice with two challenges (D), juvenile mice (E) and adult mice (H) show the presence of inflammation in the peribronchiolar areas. Scale bar =60µm. Br= bronchiole, V= vessel.

Figure 03 – Effects of allergic sensitization in mice at different ages in bronchial responsiveness (A) Infantile with one or two challenges; (B) Juvenile mice; (C) Adult mice. Values expressed as enhanced pause (Penh), Penh Max and effective dose (ED50). BAS: baseline, SAL: control animals and OVA: sensitized animals; 6 to 50: Metacholine (mg/ml) in increasing concentrations. **Penh** - Δ p=0.002 (saline dose); *p=0.017 and ** p=0.036; **Penh Max** - # p=0.023 and ## p= 0.046; **ED50** – □ p= 0.050 and □□ p= 0.014.

Figure 04 - (A) Eosinophil cell density in the airway of the different study groups, results expressed as cells/area (µm²). (B) Lymphocyte density in the airway of the different study groups, results expressed as cells/area (µm²). (C) Positively stained area of IL-5+ cells in the airways wall. Results expressed as %. (D) Positively stained area of TGFβ+ cells in the airways wall. Results expressed as %.

Figure 05 – (A) Epithelial mucus content in the airway of the different study groups, results expressed as number of points/intercept. Positively stained area of collagen content in the airways wall. Results expressed as %. (C) Positively stained area of airway smooth muscle in the airway walls. Results expressed as number of points/intercept.



D = Day of life
*OVA 10 μg in 1 mg of alum in saline 0.1ml (0.9% NaCl)
** Challenge 3% OVA or saline for 10 min/day, on 3 consecutive days in some experiments
*** Sacrifice after 48hours de last OVA challenge

Figure 01 - Study Design.

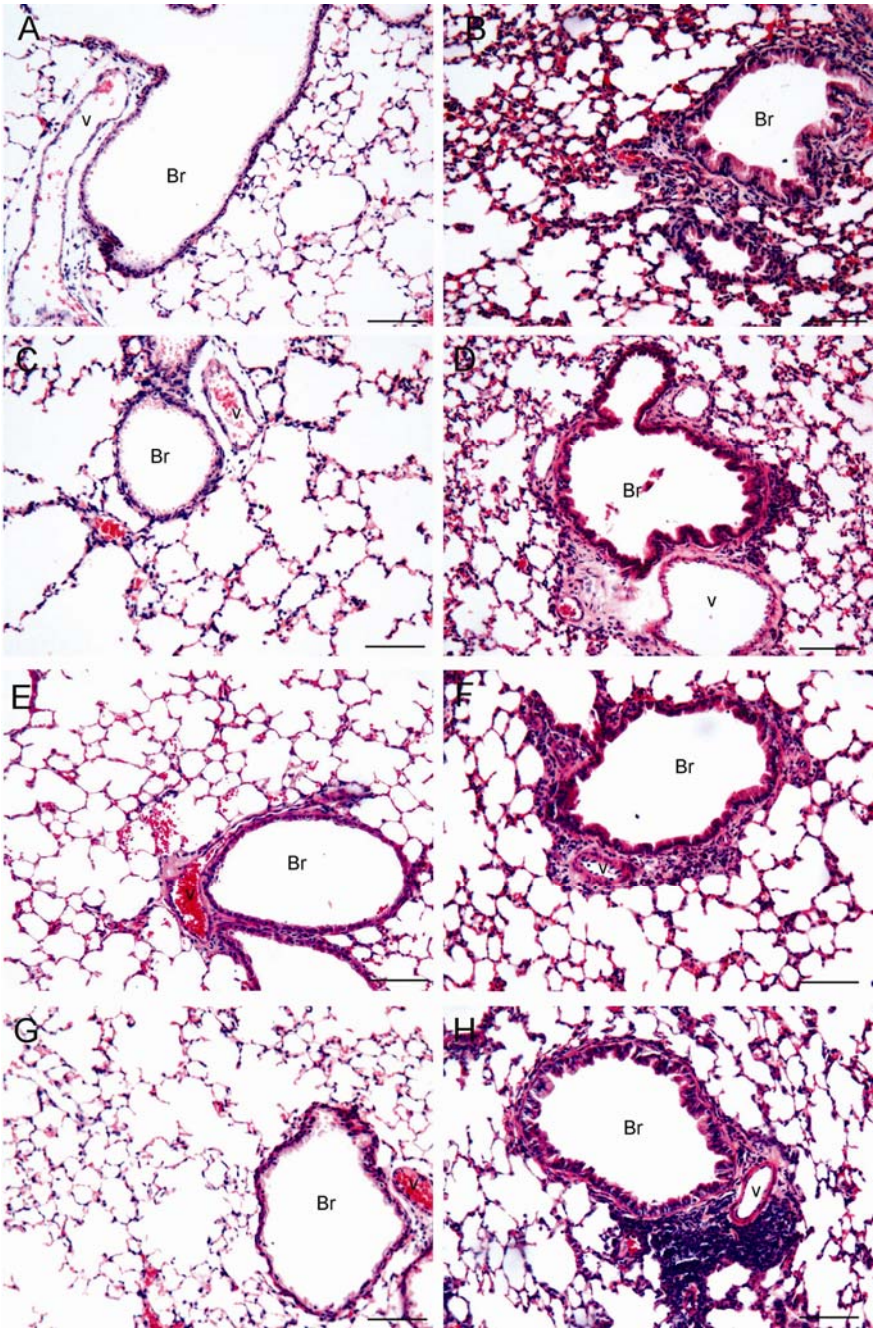


Figure 02 - The microphotographs show H&E stained sections of mice of different ages. The left panel (A, C, E, G) shows sections of control animals and the right panel shows sections of OVA-sensitized mice (B, D, E, H). Sensitized infantile mice with one challenge (B), infantile mice with two challenges (D), juvenile mice (E) and adult mice (H) show the presence of

inflammation in the peribronchiolar areas. Scale bar =60µm. Br= bronchiole, V= vessel.

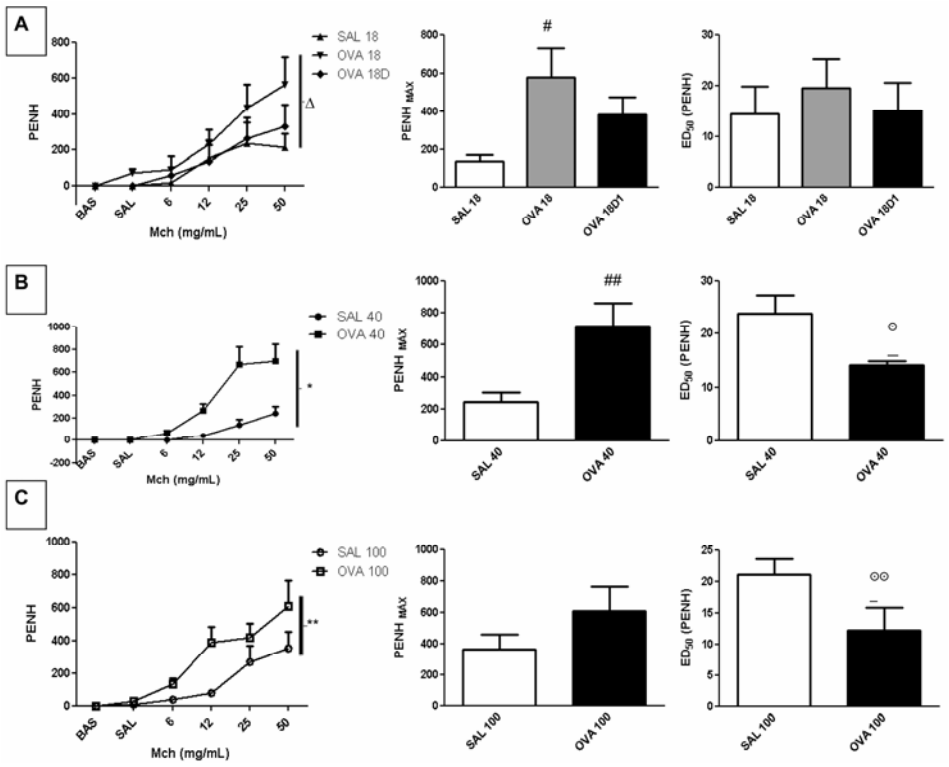


Figure 03 – Effects of allergic sensitization in mice at different ages in bronchial responsiveness (A) Infantile with one or two challenges; (B) Juvenile mice; (C) Adult mice. Values expressed as enhanced pause (Penh), Penh Max and effective dose (ED50). BAS: baseline, SAL: control animals and OVA: sensitized animals; 6 to 50: Metacholine (mg/ml) in increasing concentrations. **Penh** - Δ p=0.002 (saline dose); *p=0.017 and ** p=0.036; **Penh Max** - # p=0.023 and ## p= 0.046; **ED50** – □ p= 0.050 and □□ p= 0.014.

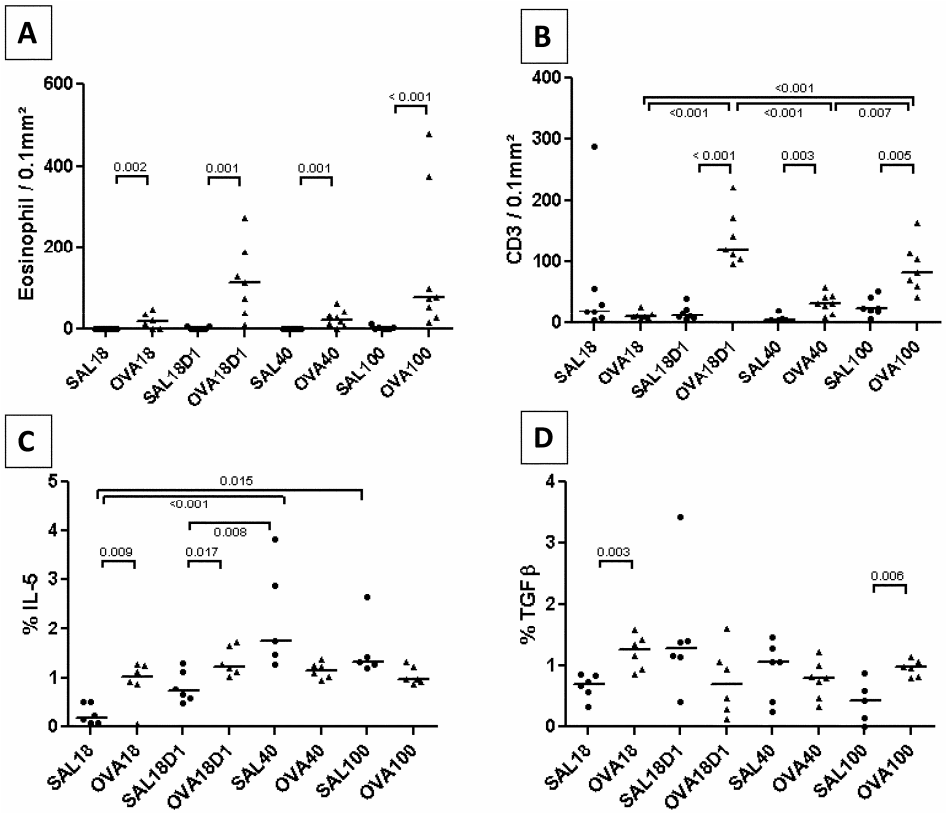


Figure 04 - (A) Eosinophil cell density in the airway of the different study groups, results expressed as cells/area (µm²). (B) Lymphocyte density in the airway of the different study groups, results expressed as cells/area (µm²). (C) Positively stained area of IL-5+ cells in the airways wall. Results expressed as %. (D) Positively stained area of TGFβ+ cells in the airways wall. Results expressed as %.

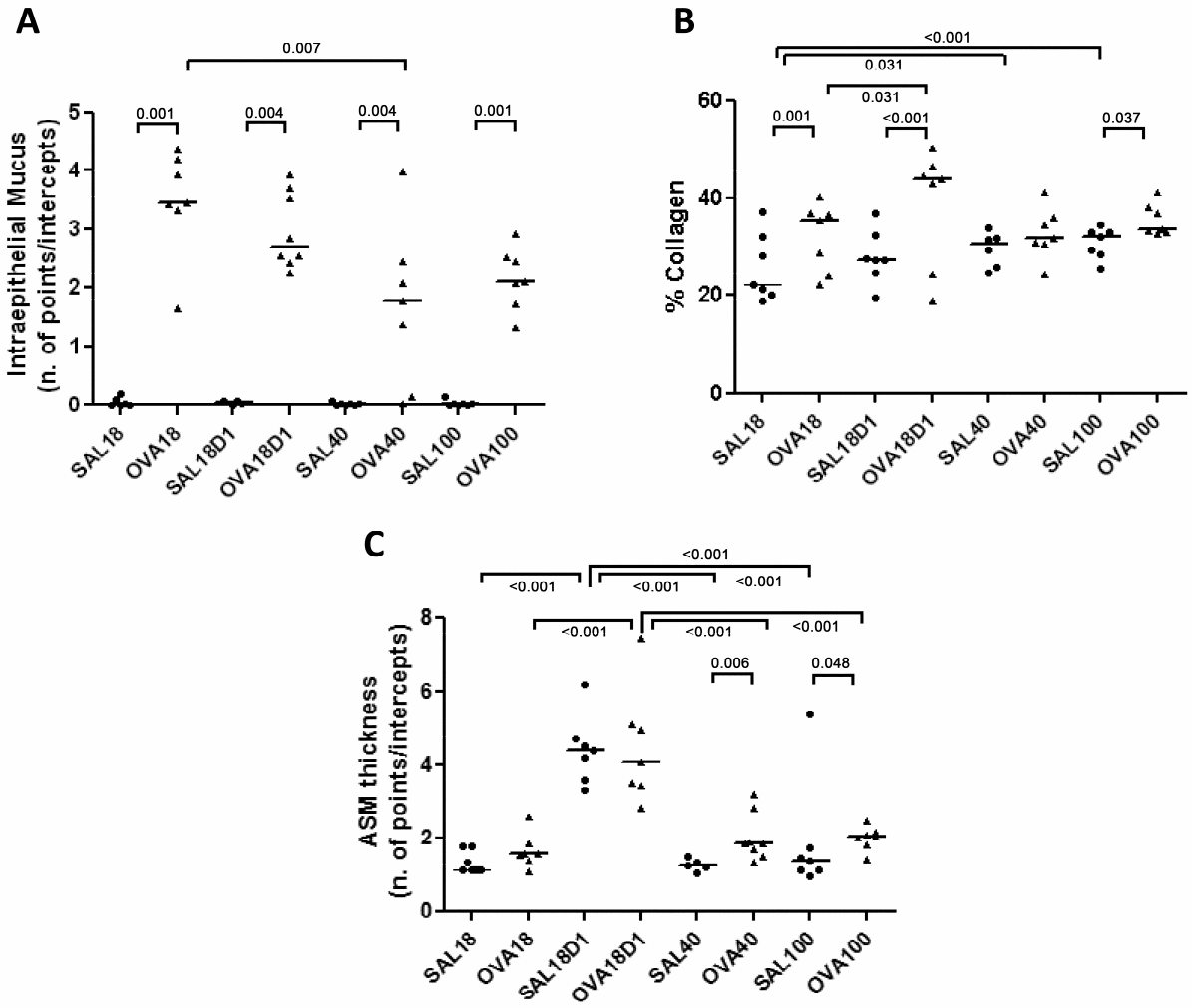


Figure 05 – (A) Epithelial mucus content in the airway of the different study groups, results expressed as number of points/intercept. Positively stained

area of collagen content in the airways wall. Results expressed as %. (C) Positively stained area of airway smooth muscle in the airway walls. Results expressed as number of points/intercept.

TABLE

Table 01 - IgE and IgG1 passive cutaneous anaphylaxis titers (PCA).

Anaphylactic antibody production in OVA immunized mice. IgE and IgG1 antibodies titres were obtained by PCA in rats and in mice, respectively, sensitized with plasma from immunized mice and challenged with OVA. The PCA titer represents the highest dilution of individual plasma that induced a positive reaction in duplicated test. The results are representative of two tests.

Study Group	IgE	IgG1	Control IgE	Control IgG1
18 D	1:20	1:25	1:5	1:5
18 D1	1:20	1:25	1:5	1:5
40 D	1:160	1:160	1:5	1:5
100 D	1:320	1:640	1:5	1:5