FERNANDA MAGALHÃES ARANTES-COSTA

Efeitos do resíduo da queima de óleo diesel (ROFA) e da inflamação pulmonar alérgica crônica em três linhagens de camundongos

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

Área de concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

São Paulo

2007

FERNANDA MAGALHÃES ARANTES-COSTA

Efeitos do resíduo da queima de óleo diesel (ROFA) e da inflamação pulmonar alérgica crônica em três linhagens de camundongos

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

**Área de concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins**

**São Paulo
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA NO VERSO DA PG DE ROSTO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a três pessoas muito especiais,

Marcelo e RAFAELA,, os amores de minha vida e

à Degobbi, minha querida amiga

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram neste trabalho:

Ao Marcelo e a Rafaela, agradeço pelo amor incondicional e principalmente pela paciência que tiveram comigo. Amo muito vocês!

Aos meus pais, Roberto e Vânia, pela excelente formação que me deram, além do amor e carinho que sempre dedicaram a mim.

Ao Milton, chefe do laboratório, agradeço às suas orientações e sugestões neste trabalho e principalmente pela oportunidade de fazer doutorado.

Ao Pepino, pelas idéias brilhantes e oportunidade de convivência.

À Thaís, pelas orientações e sugestões, além da paciência.

À Degobbi, minha dupla, agradeço por tudo que você me orientou, as inúmeras vezes que não me deixou esmorecer e às broncas: "Foca,

Fernanda Arantes, focal". O melhor deste árduo doutorado foi o fortalecimento da nossa amizade.

À Choqueta, agradeço por todo o apoio, trabalho duro e empenho durante TODAS as fases deste trabalho. Você foi uma verdadeira co-autora e acredito que um dia chegaremos lá!

Ao Pedro, agradeço pelo seu empenho e companheirismo. Acho que este trabalho ofereceu a você a chance de ver a pesquisa como ela realmente é: todos os problemas e buscas por soluções, onde você participou de tudo ativamente.

Ao Henrique, agradeço às suas idéias brilhantes e seu companheirismo.

Ao Paolo, o "jovem Einstein", que sobreviveu bravamente a esse laboratório, agradeço ao seu bom humor e amizade.

À Clarice, a "manezona", e Anna Cecília, companheiras de pós e de angústias, agradeço a amizade e convivência.

Ao Rodolfo, nosso "Golden boy", pelo apoio e sugestões brilhantes.

À Adenir pela sabedoria comigo dividida.

À Rosana pelo apoio e solidariedade.

À Leick pelo carinho.

À Tati Pelada pelo bom humor e afeto.

À Carla, Bia, Fran, Mabel, Hizume, Vanessa, agradeço a torcida.

À Regiani, agradeço pela ajuda com a ROFA

À Kelly, Rose e Ângela, técnicas da Patologia, agradeço pela confecção das lâminas e paciência.

A Edward Murphy, pessoa brilhante. Seus ensinamentos me acompanharam por todas as fases deste trabalho.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP:

Projeto Temático: Processo 02/08422-7

EPÍGRAFE

"Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!"

William Shakespeare

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de International 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. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Asma – Definição e epidemiologia.....	1
1.2 Asma – Fisiopatologia	2
1.3 Hiperresponsividade brônquica na asma.....	6
1.4 Efeitos da poluição atmosférica na asma	7
1.5 Modelos experimentais de asma	8
1.6 Modelos experimentais para o estudo dos efeitos do material particulado	9
1.7 Linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin	10
2 OBJETIVOS.....	13
3 MÉTODOS.....	14
3.1 Protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar e co- exposição à ROFA (Experimento I)	15
3.2 Protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar alérgica crônica (Experimento II)	17
3.3 Protocolo de indução da inflamação pulmonar por ROFA (Experimento III)	18
3.4 Grupos experimentais.....	19
3.5 Avaliação da responsividade pulmonar por pletismografia.....	22

3.6 Histoquímica e Imunohistoquímica	24
3.7 Análise estatística.....	27
4 . RESULTADOS.....	29
5 DISCUSSÃO.....	80
6 CONCLUSÕES.....	93
7 REFERÊNCIAS	94

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema do protocolo de sensibilização com ovalbumina e co-exposição a ROFA	15
FIGURA 2. Esquema do protocolo de sensibilização com ovalbumina	18
FIGURA 3. Esquema do protocolo de exposição a ROFA	19
FIGURA 4. Fotomicrografias de pulmões de camundongos BALB/c corados com HE	31
FIGURA 5. Penh (índice de broncoconstrição) obtido após administração de metacolina inalatória em concentrações crescentes em camundongos BALB/c	32
FIGURA 6. Área sob a curva de penh obtida após administração de concentrações crescentes de metacolina inalatória em camundongos BALB/c	33
FIGURA 7. Densidade de eosinófilos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos BALB/c	35
FIGURA 8. Densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos BALB/c	36
FIGURA 9. Densidade de macrófagos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos BALB/c	37

FIGURA 10. Fotomicrografias de pulmões de camundongos BALB/c corados com PAS-AB	39
FIGURA 11. Área epitelial nas vias aéreas de camundongos BALB/c	41
FIGURA 12. Área ocupada por células ciliadas nas vias aéreas de camundongos BALB/c	42
FIGURA 13. Área ocupada por células secretoras nas vias aéreas de camundongos BALB/c	44
FIGURA 14. Volume de muco ácido armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos BALB/c	45
FIGURA 15. Volume de muco neutro armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos BALB/c	46
FIGURA 16. Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA corados com HE	48
FIGURA 17. Penh (índice de broncoconstrição) obtido após administração de metacolina inalatória em concentrações crescentes em camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA	49
FIGURA 18. Área sob a curva de Penh obtida após administração de concentrações crescentes de metacolina inalatória em camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA	50
FIGURA 19. Densidade de eosinófilos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de	52

camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA

- FIGURA 20.** Densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 53
- FIGURA 21.** Densidade de macrófagos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 54
- FIGURA 22.** Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA corados com PAS-AB 56
- FIGURA 23.** Área epitelial nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 58
- FIGURA 24.** Área ocupada por células ciliadas nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 59
- FIGURA 25.** Área ocupada por células secretoras nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 60
- FIGURA 26.** Volume de muco ácido armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 62
- FIGURA 27.** Volume de muco neutro armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizado por OVA 63
- FIGURA 28.** Fotomicrografias de pulmões de camundongos 65

AIRmax e AIRmin expostos a ROFA corados com HE

- FIGURA 29.** Penh (índice de broncoconstrição) obtido após administração de metacolina inalatória em concentrações crescentes em camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA 66
- FIGURA 30.** Área sob a curva de Penh obtida após administração de concentrações crescentes de metacolina inalatória em camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA 67
- FIGURA 31.** Densidade de eosinófilos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin 69
- FIGURA 32.** Densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA 70
- FIGURA 33** Densidade de macrófagos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA 71
- FIGURA 34.** Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA corados com PAS-AB 73
- FIGURA 35.** Área epitelial nas vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA 75
- FIGURA 36.** Área ocupada por células ciliadas nas vias aéreas 76

de camundongos AIRmax e AIRmin expostos a ROFA

FIGURA 37. Área ocupada por células secretoras de muco nas **77**
vias aéreas de camundongos AIRmax e AIRmin expostos
a ROFA

FIGURA 38. Volume de muco ácido armazenado em células **79**
secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax e
AIRmin expostos a ROFA

FIGURA 39. Volume de muco neutro armazenado em células **80**
secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax e
AIRmin expostos a ROFA

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de elementos em amostra de resíduo de incineração obtidas pelo método de ativação com nêutrons.....	16
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ROFA – resíduo da queima de óleo diesel, do inglês “residual oil fly ash”

HE – hematoxilina e eosina

PAS-AB – ácido periódico de Schiff - azul alciano

Penh – índice de broncoconstrição, do inglês “enhanced pause”

OVA - ovalbumina

IgE – imunoglobulina E

IL - interleucina

AIR – resposta inflamatória aguda

ALUMEN – Hidróxido de alumínio

IP - intraperitoneal

IN - intranasal

TE – tempo expiratório

TI – tempo inspiratório

TR – tempo de relaxamento

PFE – pico de fluxo expiratório

PFI - Pico de fluxo expiratório

Mch - metacolina

TGF- α - fator de crescimento tumoral α

EGFR – fator de crescimento epidermal

MIP-2 – proteína inflamatória anti-macrofágica-2

GM-CSF – fator de estímulo de crescimento de colônias de granulócitos e
macrófagos

DMTU - dimetiltiouréia

ROFA-s – ROFA solúvel

LISTA DE ABREVIATURAS

ROFA – resíduo da queima de óleo diesel, do inglês “residual oil fly ash”

HE – hematoxilina e eosina

PAS-AB – ácido periódico de Schiff - azul alciano

Penh – índice de broncoconstrição, do inglês “enhanced pause”

OVA - ovalbumina

IgE – imunoglobulina E

IL - interleucina

AIR – resposta inflamatória aguda

ALUMEN – Hidróxido de alumínio

IP - intraperitoneal

IN - intranasal

TE – tempo expiratório

TI – tempo inspiratório

TR – tempo de relaxamento

PFE – pico de fluxo expiratório

PFI - Pico de fluxo expiratório

Mch - metacolina

TGF- α - fator de crescimento tumoral α

EGFR – fator de crescimento epidermal

MIP-2 – proteína inflamatória anti-macrofágica-2

GM-CSF – fator de estímulo de crescimento de colônias de granulócitos e
macrófagos

DMTU - dimetiltiouréia

ROFA-s – ROFA solúvel

RESUMO

Arantes-Costa FM. Efeitos do resíduo da queima de óleo diesel (ROFA) e da inflamação pulmonar alérgica crônica em três linhagens de camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Neste estudo, foram realizados três experimentos distintos (1) analisando os efeitos da administração de material particulado em camundongos BALB/c com inflamação pulmonar alérgica crônica induzida por ovalbumina; (2) comparando camundongos AIRmax e AIRmin com inflamação pulmonar alérgica crônica induzida por ovalbumina; (3) comparando camundongos AIRmax e AIRmin que receberam material particulado (resíduo da queima de óleo diesel - ROFA) por via intranasal. Para a indução da inflamação pulmonar alérgica crônica, os camundongos foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) através de duas injeções intraperitoneais de alérgeno com o adjuvante hidróxido de alumínio (dias 0 e 14) e quatro inalações de OVA 1% (dias 22, 24, 26 e 28). Os animais que foram expostos ao material particulado, receberam ROFA (60 µg) nos dias 0, 2, 4 e 6 no experimento do efeito do material particulado ou nos dias dos desafios com OVA no experimento do efeito da administração de material particulado em animais com inflamação pulmonar induzida pela OVA. Os grupos controle foram tratados com solução salina 0,9 % seguindo o mesmo protocolo. Quarenta e oito horas após o último desafio, a responsividade pulmonar foi medida por broncoprovocação à metacolina através da pletismografia de corpo inteiro, após a qual os animais foram sacrificados e tiveram os pulmões removidos

para análise histológica. O estudo realizado com animais BALB/c para análise dos efeitos do material particulado sobre a resposta inflamatória induzida pela ovalbumina mostrou um aumento de responsividade nos animais inflamados e co-expostos ao material particulado, sem efeito sobre a inflamação ou remodelamento epitelial induzidos pela OVA. A exposição ao material particulado por si só levou a uma diminuição da área ocupada por células ciliadas e a um aumento da responsividade pulmonar. O experimento realizado com camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin para estudar eventuais diferenças entre a resposta destas linhagens à inflamação pulmonar crônica induzida pela OVA mostrou uma maior susceptibilidade dos animais AIRmin, com maior infiltrado eosinofílico nas vias aéreas e responsividade pulmonar. Por outro lado, o estudo realizado para verificar a ação do material particulado nas linhagens AIRmax e AIRmin mostrou um intenso remodelamento epitelial, com infiltrado macrofágico ao redor das vias aéreas de ambas as linhagens, porém os animais AIRmin apresentaram maior responsividade pulmonar que os AIRmax quando expostos ao material particulado. Assim pudemos concluir que (1) a exposição ao material particulado na presença de inflamação pulmonar alérgica crônica amplifica o remodelamento epitelial e a responsividade pulmonar; o *background* genético influencia (2) a inflamação eosinofílica e a responsividade pulmonar induzidas pela inflamação alérgica crônica bem como (3) a responsividade pulmonar induzida pela exposição ao material particulado.

Descritores: modelos animais; asma; material particulado; inflamação, pulmão; reatividade brônquica; mucosa respiratória; camundongos.

SUMMARY

Arantes-Costa FM. Effects of residual diesel oil fly ash (ROFA) and pulmonary allergic chronic inflammation in tree lines of mice [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007.

In this study, three distinct experiments were performed (1) examining the effects of administration of particulate matter in BALB/c mice with chronic allergic pulmonary inflammation induced by ovalbumin; (2) comparing AIRmax and AIRmin mice with chronic allergic pulmonary inflammation induced by ovalbumin; (3) comparing AIRmax and AIRmin mice receiving particulate matter (residue from the burning of diesel oil - ROFA) intranasally. For the induction of chronic allergic pulmonary inflammation, the mice were sensitized to ovalbumin (OVA) through two intraperitoneal injections of allergen with adjuvant aluminum hydroxide (days 0 and 14) and four inhalations of OVA 1% (days 22, 24, 26 and 28). The animals that were exposed to particulate matter received ROFA (60 µg) on days 0, 2, 4 and 6 in the study of the effect of the particulate matter or after the challenges with OVA in experiment of the effect of administration of particulate matter in animals with pulmonary inflammation induced by OVA. The control groups were treated with saline 0.9% following the same protocol. Forty eight hours after the last challenge, pulmonary responsiveness was measured through broncoprovocation to methacholine by whole body plethysmography, after which the animals were sacrificed and the lungs were removed for histologic analysis. The study conducted on animals BALB/c for analysis of the effects

of particulate matter on the inflammatory response induced by ovalbumin showed an increase of responsiveness in animals with allergic inflammation and exposed to the particulate matter, without effects on inflammation or epithelial remodeling induced by OVA. Exposure to particulate matter led to a reduction in the area occupied by ciliated cells and increased lung responsiveness. The experiment in AIRmax AIRmin mice to study possible differences in the response of these strains to chronic lung inflammation induced by OVA showed greater susceptibility of AIRmin, with more eosinophilic infiltration in airway and greater lung responsiveness. The study to check the action of particulate matter in the lines AIRmax and AIRmin showed an intense epithelial remodeling, with macrophagic infiltrate around the airways of both strains. However, AIRmin mice had higher pulmonary responsiveness than AIRmax when exposed to particulate matter. We conclude that (1) exposure to particulate matter in the presence of chronic allergic pulmonary inflammation amplifies the epithelial remodeling and pulmonary responsiveness; the genetic background influences (2) the pulmonary responsiveness and eosinophilic inflammation induced by chronic allergic inflammation and (3) the pulmonary responsiveness induced by exposure to particulate matter.

Keywords: animal models; asthma; particulate matter; inflammation; lung; respiratory mucosa; bronchial hyperreactivity; mice.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma – Definição e epidemiologia

A asma é definida como: “distúrbio inflamatório crônico das vias aéreas, no qual diversas células e elementos celulares exercem importante papel. O quadro de inflamação crônica está associado à hiperresponsividade das vias aéreas que leva a episódios recorrentes de chiado, dispnéia e tosse, principalmente à noite ou no início da manhã. Esses episódios estão associados à obstrução ao fluxo de ar, que é reversível, pelo menos parcialmente, espontaneamente ou após tratamento (1).

A asma é um problema mundial. Esta síndrome afeta cerca de 300 milhões de indivíduos, com mortalidade mundial de aproximadamente 250 mil doentes por ano. Estima-se que a prevalência mundial seja entre 1 e 18%, dependendo do país estudado. Embora existam evidências de que a prevalência da asma esteja aumentando em alguns países, em outros ela já está estabilizada (1).

1.2 Asma – Fisiopatologia

A inflamação constitui o mais importante fator fisiopatológico da asma. É resultante de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores inflamatórios e células estruturais das vias aéreas.

A primeira etapa para o desenvolvimento da asma é a sensibilização a algum antígeno. As células dendríticas presentes na mucosa brônquica atuam como apresentadoras de antígenos (2). A interação dessas células com linfócitos T auxiliares faz com que, em indivíduos atópicos, os linfócitos B sejam estimulados, produzindo imunoglobulinas E (IgE), que liberadas na circulação se ligam a receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos (3). Em consequência deste processo, nos próximos contatos com agentes desencadeantes, a grande maioria dos pacientes asmáticos desenvolve uma fase imediata e uma tardia. A fase imediata se instala em poucos minutos e é caracterizada fundamentalmente pela obstrução de vias aéreas. O principal fator da obstrução brônquica, nesta fase, é a contração da musculatura lisa brônquica (4). A fase tardia ocorre em aproximadamente 60% dos indivíduos, de 3 a 7 horas depois do contato com o alérgeno, e está associada a hiperresponsividade brônquica e a inflamação eosinofílica das vias aéreas (5).

A inflamação das vias aéreas na asma é persistente, mesmo que os sintomas sejam esporádicos, e a relação entre a gravidade da asma e a intensidade da inflamação não está completamente esclarecida (6). A inflamação afeta todas as vias aéreas incluindo, na maioria dos pacientes, as vias aéreas superiores e nariz, embora seus efeitos fisiopatológicos sejam mais evidentes em brônquios.

O padrão de inflamação característico encontrado em doenças alérgicas como a asma apresenta mastócitos ativados, maior número de eosinófilos ativados, e um aumento no número de receptores em células T.

Os mastócitos ao serem ativados na mucosa liberam mediadores broncoconstritores, como histamina, cisteinil leucotrienos e prostaglandinas D2 (7). Essas células são ativadas por antígenos ligados a receptores IgE de alta afinidade, bem como por estímulo osmótico (no caso de bronconconstrição induzida por exercício). O aumento do número de mastócitos na musculatura lisa das vias aéreas parece estar correlacionado com a hiperresponsividade (8).

Os eosinófilos, presentes em número aumentado nas vias aéreas, liberam proteínas básicas que podem lesar as células epiteliais das vias aéreas. Eles também estão correlacionados de maneira importante com a liberação de fatores de crescimento e no remodelamento das vias aéreas (8).

Os linfócitos T, presentes em número aumentado nas vias aéreas, liberam citocinas específicas, incluindo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que orquestram a inflamação eosinofílica e a produção de IgE pelos linfócitos B (9).

As células dendríticas capturam alérgenos na superfície das vias aéreas e migram até os linfonodos regionais, onde elas interagem com as células T reguladoras e estimulam a produção de células Th2 (10).

Os macrófagos estão em maior número nas vias aéreas e podem ser ativados por antígenos através de receptores de IgE de baixa afinidade, liberando mediadores inflamatórios e citocinas que amplificariam a resposta inflamatória (11).

Os neutrófilos apresentam-se em número aumentado nas vias aéreas e no escarro de pacientes com asma grave e em asmáticos fumantes, mas o papel fisiopatológico destas células na asma não está plenamente esclarecido. Seu maior número pode estar relacionado, em parte, à terapia de corticoesteróides (12).

As células estruturais das vias aéreas também produzem mediadores inflamatórios e contribuem para a persistência da inflamação por várias maneiras.

As células epiteliais das vias aéreas expressam diversas proteínas inflamatórias na asma e liberam citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. Vírus e poluentes interagem com as células epiteliais. As células da musculatura lisa das vias aéreas expressam proteínas inflamatórias semelhantes às células epiteliais (13).

As células endoteliais da circulação brônquica atuam no recrutamento de células inflamatórias da circulação para a via aérea.

Os fibroblastos e miofibroblastos produzem componentes do tecido conjuntivo, como colágeno e proteoglicanos, que estão envolvidos no remodelamento das vias aéreas.

Os nervos das vias aéreas também estão envolvidos. Os nervos colinérgicos podem ser ativados em reflexo ao espessamento das vias aéreas e levar a broncoconstrição e secreção de muco. Os nervos sensoriais, os quais podem ser sensibilizados por estímulos inflamatórios incluindo neutrofílicos, causam alterações reflexas e sintomas como a tosse, podendo ainda liberar neuropeptídeos inflamatórios (14).

1.3 Hiperresponsividade brônquica na asma

A hiperresponsividade das vias aéreas, anormalidade funcional característica da asma, resulta em estreitamento das vias aéreas em resposta a estímulos que seriam inócuos em uma pessoa saudável. Por sua vez, este estreitamento leva a uma limitação variável do fluxo aéreo e a sintomas intermitentes.

Os possíveis mecanismos envolvidos são: contratura excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, resultante de aumento de volume e/ou contratilidade dessas células (15); desacoplamento da musculatura lisa (16); espessamento da parede da via aérea por edema ou mudanças estruturais amplificando o estreitamento da via aérea uma vez que a luz apresenta-se diminuída (17); e ainda os nervos sensoriais podem se apresentar sensibilizados pela inflamação, levando a broncoconstrição exagerada em resposta a variados estímulos.

1.4 Efeitos da poluição atmosférica na asma

Os fatores que influenciam o risco de asma podem ser divididos entre aqueles que causam o desenvolvimento da asma e aqueles que desencadeiam os sintomas, alguns fatores agem em ambos os mecanismos. Os primeiros englobam fatores intrínsecos (que são principalmente genéticos como genes que predispõe a hiperresponsividade e/ou atopia, sexo, obesidade) enquanto que os desencadeadores de sintomas normalmente são fatores ambientais, como alérgenos, infecções, fumaça de cigarro, dieta e poluição ambiental (18).

Diversos estudos têm sugerido que os poluentes externos agravam os sintomas (19), possivelmente por apresentarem um efeito aditivo na exposição a alérgenos (20). Existe uma relação entre o aumento no número de exacerbações de asma com elevações nos níveis de poluição do ar e isso pode estar correlacionado com o aumento geral de poluentes ou a um aumento alérgeno-específico, para o qual o indivíduo é sensível (21-23). Diversos estudos epidemiológicos mostram uma associação significativa entre poluentes atmosféricos, como ozônio, óxido de nitrogênio, aerossóis ácidos e material particulado com sintomas ou exacerbação da asma (24-27).

1.5 Modelos experimentais de asma

Diversos modelos animais têm sido desenvolvidos para estudar a patogênese de doenças e para descoberta de tratamentos (28, 29), usando-se cobaias, coelhos, porcos, ovelhas, ratos, gatos, cachorros, macacos ou cavalos (30). No entanto, desde que o primeiro modelo de asma alérgica em camundongos foi publicado em 1994 (31), o camundongo se tornou um dos animais mais estudados.

Utiliza-se uma ampla variedade de antígenos, rotas de administração, adjuvantes, protocolos experimentais e linhagens, levando a hiperresponsividade de vias aéreas, inflamação eosinofílica pulmonar, hipersecreção de muco e elevado título de IgE, que são características da doença humana (30).

O modelo mais comumente utilizado é o de sensibilização por ovalbumina, proteína da clara do ovo. Alguns autores utilizam apenas instilações intranasais ou aerossol de solução de ovalbumina (32), enquanto que outros autores induzem primeiramente uma inflamação sistêmica e depois desafiam com inalação do mesmo antígeno (33, 34).

Embora os camundongos desenvolvam características semelhantes à doença humana, existem diferenças entre as duas. Incluindo: (1)

hiperresponsividade de vias aéreas transitória ou ausência de aumento de contratatura de musculatura lisa das vias aéreas enquanto que nos humanos a hiperresponsividade é persistente; (2) ausência de um modelo duradouro de atividade inflamatória já que nos humanos a doença é inflamatória crônica; (3) diferença entre a anatomia pulmonar e a função eosinofílica entre camundongos e humanos. Apesar destas diferenças, estes modelos desenvolvidos em camundongos apresentam características semelhantes à doença clínica e são úteis para teste de novos agentes terapêuticos (30).

1.6 Modelos experimentais para o estudo dos efeitos do material particulado

Os estudos com administração de material particulado em modelos de asma em camundongos apresentaram resultados aparentemente contraditórios a respeito da exacerbação da inflamação pulmonar, provavelmente devido aos diferentes protocolos de sensibilização e desafio a alérgenos e à composição, dosagem e via de administração do particulado (35-39). Há também diferenças substanciais na modulação da inflamação alérgica de vias aéreas, respostas de IgE e/ou IgG antígeno-específicas e remodelamento de via aérea em camundongos (40-44).

A ROFA (“residual oil fly ash”) foi usada em diversos estudos experimentais como uma partícula substituta para investigar os mecanismos das respostas à inalações de material particulado em animais experimentais

(24, 45-47). A ROFA é um material particulado coletado de caldeira movida a óleo, homogêneo e rico em metais de transição solúveis. A administração de ROFA em camundongos com inflamação pulmonar induzida por alérgeno resultou em um aumento na produção de citocinas Th2, no recrutamento eosinofílico e na hiperresponsividade de vias aéreas (32, 36, 39, 48, 49).

1.7 Linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin

Duas linhagens de camundongos (AIRmax e AIRmin) foram produzidas por seleção bidirecional baseada na habilidade de desenvolver uma resposta inflamatória aguda (AR) intensa (máximo) ou fraca (mínima). Este processo seletivo foi iniciado em uma população resultante do inter cruzamento de oito linhagens isogênicas. A AR foi quantificada pelo número de células inflamatórias recrutadas e pela concentração da proteína exudada no local da injeção de grânulos de poliacrilamida, uma substância quimicamente inerte e não-imunogênica. Após diversas gerações de processo seletivo, a diferença principal entre camundongos AIRmax e AIRmin estava na produção e na mobilização dos neutrófilos no infiltrado inflamatório induzido por diversos agentes (50).

Alterações na granulopoiese da medula em resposta a fatores hematopoiéticos, assim como a produção de fatores quimiotáticos por células inflamatórias residentes ou infiltradas contribuem para essa diferença fenotípica entre as duas linhagens (51). As diferenças entre as respostas

inflamatórias são refletidas em alterações entre resistência/susceptibilidade das linhagens selecionadas em diversas doenças. AIRmax mostrou-se resistente e AIRmin susceptível a infecções bacterianas intracelulares (52) enquanto que o AIRmax é extremamente susceptível e o AIRmin resistente à artrite induzida por pristane (53).

Considerando a tumorigênese, os camundongos AIRmax mostram-se significativamente mais resistentes que os camundongos AIRmin ao desenvolvimento de tumores induzidos por diversos carcinógenos (54, 55). Porém, usando uretano como carcinogênico, os animais AIRmin desenvolveram uma inflamação pulmonar sub-aguda persistente e maior multiplicidade de tumor que os animais AIRmax (56). Apesar do intenso número de trabalhos utilizando estas linhagens em diversas doenças, até o presente momento, não houve modelos experimentais de doença pulmonar inflamatória crônica utilizando camundongos AIRmax e AIRmin.

Uma pergunta que tem sido considerada relevante no estudo da asma é a influência da exposição ao material particulado sobre a intensidade da inflamação pulmonar presente na asma. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a administração de material particulado (ROFA) poderia interferir sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos, sendo que utilizamos, nestes experimentos, camundongos BALB/c. Estudamos, também, se o efeito da ROFA era diferente em camundongos com alta e baixa resposta inflamatória. Finalmente, avaliamos

se a inflamação pulmonar alérgica induzida por exposições à ovoalbumina poderia, também, ser diferente em camundongos AIRmax e AIRmin.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

- 1) Examinar os efeitos da administração intranasal da cinza residual da queima de óleo diesel (ROFA) na inflamação pulmonar, responsividade pulmonar e excesso de produção de muco em um modelo murino de inflamação pulmonar alérgica em animais BALB/c (EXPERIMENTO I);
- 2) Estudar se há diferenças na resposta inflamatória crônica induzida pela sensibilização com ovalbumina em camundongos selecionados para máxima resposta inflamatória aguda (AIRmax) e mínima (AIRmin) (EXPERIMENTO II);
- 3) Estudar se há diferenças na resposta inflamatória induzida pela administração de ROFA em camundongos AIRmax e AIRmin (EXPERIMENTO III).

MÉTODOS

3 MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de Laboratório” publicado por National Institutes of Health (NIH publication 85-23, revisado em 1985) e todos os experimentos foram realizados sob anestesia geral.

Foram utilizados camundongos das linhagens *BALB/c* (Experimento I), *AIRmax* e *AIRmin* (Experimentos II e III), machos, adultos, com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais *BALB/c* foram provenientes do centro multidisciplinar para investigação biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB) e os animais *AIRmax* e *AIRmin* foram provenientes do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Os camundongos foram mantidos no biotério de manutenção dos Laboratórios de Investigação Médica – LIM 05 e 20, sob alimentação e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em grupos, segundo os critérios de sensibilização e indução da inflamação pulmonar e/ou segundo a administração intranasal de ROFA (resíduo proveniente da queima de óleo diesel).

A ROFA utilizada neste estudo foi coletada de uma caldeira localizada na lavanderia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e é composta pelos resíduos particulados provenientes da queima do óleo diesel. Sua composição foi determinada utilizando-se o método de ativação de nêutrons (tabela 1).

3.1 Protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar e co-exposição à ROFA (Experimento I)

Examinamos os efeitos da administração intranasal de ROFA na inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos BALB/c. A sensibilização se deu conforme descrito no protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar alérgica crônica (item 3.1) enquanto que a exposição a ROFA se deu conforme o protocolo de indução da inflamação pulmonar por ROFA (item 3.2), de uma a três horas depois do desafio com aerossol de ovalbumina (Figura 1).

Figura 1. Esquema do Protocolo de sensibilização com ovalbumina e co-exposição a ROFA.

Tabela 1. Concentrações de elementos em amostra de resíduo de incineração obtidas pelo método de ativação com nêutrons.

Elementos	ROFA-HU
As, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$9,3 \pm 1,0^*$
Br, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$8,7 \pm 0,6$
Ca %	$0,59 \pm 0,04$
Co, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$122,9 \pm 3,1$
Cr, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$32,4 \pm 0,4$
Cs, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$0,58 \pm 0,04$
Fe, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$3,28 \pm 0,07$
Hf, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$1,64 \pm 0,03$
Rb, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$11,4 \pm 1,1$
Sb, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$39,8 \pm 0,7$
Sc, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$1,111 \pm 0,007$
Se, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$20,5 \pm 0,2$
Th, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$3,07 \pm 0,03$
U, $\mu\text{g.g}^{-1}$	ND**
Zn, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$115,7 \pm 1,5$
La, $\mu\text{g.g}^{-1}$	972 ± 12
Ce, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$51,1 \pm 0,4$
Nd, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$33,1 \pm 2,9$
Sm, $\mu\text{g.g}^{-1}$	$2,69 \pm 0,08$

(*) – As incertezas das análises foram calculadas considerando erros nas medidas das taxas de contagens da amostra e corrosão.

(**) – ND indica que não foi detectado o elemento nas condições experimentais adotadas.

3.2 Protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar alérgica crônica (Experimento II)

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve a duração de 30 dias (Figura 2). Os camundongos AIRmax e AIRmin sensibilizados receberam solução de 50 µg de ovoalbumina liofilizada (Advanced Nutrition Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) (OVA) e 6 mg de Hidróxido de Alumínio – Alumen (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil) em um volume total de 0,2 mL por via intraperitoneal (i.p.) nos dias 0 e 14.

Nos dias 22, 24, 26 e 28 os animais foram colocados em uma caixa de exposição acoplada a um nebulizador ultrassônico (Pulmoclear II, Soniclear, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de aerossol de ovoalbumina (OVA) diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/mL (1%), por 30 minutos. O grupo controle (SAL) recebeu solução salina (NaCl 0,9%) e hidróxido de alumínio (Alumen) (6 mg) por via intraperitoneal (i.p.) e nos dias dos desafios inalatórios foram expostos ao aerossol de solução salina 0,9% por 30 minutos.

Os estudos foram realizados quarenta e oito horas (48 horas) após o último desafio antigênico, ou seja, no dia 30.

Figura 2. Esquema do Protocolo de sensibilização com Ovalbumina

3.3 Protocolo de indução da inflamação pulmonar por ROFA (Experimento III)

A ROFA (residual oil fly ash) utilizada neste estudo foi obtida da caldeira movida a óleo, existente no Hospital Universitário (HU) da Universidade de São Paulo.

Para produzir o modelo de inflamação pulmonar por material particulado, uma solução de ROFA (60 μg de ROFA diluído em 10 μL de salina) foi instilada por via intranasal em camundongos AIRmax e AIRmin

acordados, por quatro dias com intervalo de 48 horas entre as instilações (Figura 3)

Figura 3. Esquema do protocolo de exposição a ROFA

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram subdivididos em quatro grupos para cada um dos experimentos realizados:

Experimento I: Sensibilização e indução da inflamação pulmonar e co-exposição a ROFA em camundongos BALB/c

SAL+SAL: Camundongos BALB/c que receberam salina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução salina 0,9% aerossol, bem como solução salina (10 μ L) por via intranasal (n=8);

SAL+ROFA: Camundongos BALB/c que receberam salina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução salina 0,9% aerossol, além de solução de ROFA (60 µg/10 µL) por via intranasal (n=8);

OVA+SAL: Camundongos BALB/c sensibilizados por ovoalbumina, que receberam ovalbumina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução de ovalbumina aerossol segundo protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar e que receberam solução salina por via intranasal (n=7);

OVA+ROFA: Camundongos BALB/c sensibilizados por ovoalbumina, que receberam ovalbumina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução de ovalbumina aerossol segundo protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar e que receberam solução de ROFA por via intranasal (n=7);

Experimento II: Sensibilização e indução da inflamação pulmonar em camundongos AIRmax e AIRmin por OVA

MAXSAL: Camundongos AIRmax que receberam salina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução salina 0,9% aerossol (n=8);

MAXOVA: Camundongos AIRmax sensibilizados por ovoalbumina, que receberam ovalbumina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução de ovalbumina aerossol segundo protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar (n=8);

MINSAL: Camundongos *AIRmin* que receberam salina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução salina 0,9% aerossol (n=9);

MINOVA: Camundongos *AIRmin* sensibilizados por ovoalbumina, que receberam ovalbumina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução de ovalbumina aerossol segundo protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar (n=8);

Experimento III: Indução da inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos AIRmax e AIRmin por ROFA

MAXSAL: Camundongos *AIRmax* que receberam solução salina (10 μ L) por via intranasal (n=8);

MAXROFA: Camundongos *AIRmax* que receberam solução de ROFA (60 μ g/10 μ L) por via intranasal (n=7);

MINSAL: Camundongos *AIRmin* que receberam solução salina (10 μ L) por via intranasal (n=9);

MINROFA: Camundongos *AIRmin* que receberam solução de ROFA (60 μ g/10 μ L) por via intranasal (n=7);

3.5 Avaliação da responsividade pulmonar por pletismografia

Quarenta e oito horas após o último desafio com OVA ou instilação de ROFA, a responsividade pulmonar à metacolina (Mch) foi avaliada em camundongos conscientes usando sistema de pletismografia de corpo inteiro (Buxco Europe, Winchester, Reino Unido).

Os camundongos foram colocados em um pletismógrafo de corpo inteiro respirando espontaneamente para a coleta dos valores de fluxo. O pletismógrafo utilizado, específico para camundongo (PLY 3211), apresenta dois orifícios que conectam o interior da câmara ao meio externo, a fim de equilibrar as pressões e possui uma saída de ar, ligada a uma bomba de sucção (fluxo de 1 L/min) para realizar a troca do ar no interior da câmara e evitar a hipóxia/hipercapnia do animal.

Ligado ao pletismógrafo há um transdutor de pressão, que por ter sido calibrado com a injeção de 1 mL de ar na câmara, torna-se capaz de mensurar volumes e fluxos deslocados dentro do pletismógrafo durante a respiração do animal.

Utilizamos os seguintes parâmetros de aceitação: fluxo inspiratório mínimo de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$; frequência respiratória de 40-400 RPM; filtro de 20 ms; tempo de relaxamento a 36% do volume corrente; volume corrente típico

de 0,1 mL e os seguintes parâmetros de rejeição: tempo expiratório máximo 2,0 s; mínimo volume corrente 0,04 mL; mínimo tempo inspiratório 0,04s.

Foram calculados os tempos de expiração (TE), de inspiração (TI) e relaxamento (TR; definido como o tempo de queda até 36% do volume total expirado), os picos de fluxos expiratórios (PFE) e inspiratórios (PIF). Os valores de Penh (do inglês “enhanced pause”) foram calculados a partir dos picos de pressões, usando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Penh} = [(TE/0,3RT) - 1] \times (2PEF/3PIF)$$

Sendo Penh = enhanced pause (índice de broncoconstrição), TE = tempo expiratório (s), RT = tempo de relaxamento (s), PEF = pico de fluxo expiratório (mL/s), e PIF = pico de fluxo inspiratório (mL/s).

O Penh é considerado um parâmetro empírico que reflete alterações no formato da onda medida no sinal gerado pela câmara de pressão tanto da inspiração como da expiração e combina isso com o tempo de comparação da expiração recente e tardia (Pausa) (57). Não é uma função da amplitude pressórica absoluta da câmara ou da frequência respiratória, mas sim a união da razão do sinal pressórico gerado pela inspiração e expiração e o tempo de expiração (57, 58). Dessa forma é possível quantificar a limitação do fluxo aéreo.

As medidas basais foram adquiridas durante quatro minutos, após a ambientação dos animais. Em seguida os camundongos foram expostos a aerossol de solução salina por 3 minutos (fluxo de 3,6 mL/min) e aguardou-se por mais 2 minutos após o término da inalação para início da próxima dose de aerossol. Foram administradas as seguintes concentrações de metacolina: 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL. As medidas foram obtidas por 5 minutos (sendo 3 minutos de nebulização e 2 minutos após). Os valores de Penh foram calculados como a média de 25 ciclos respiratórios, e as médias dos valores cumulativos foram obtidas para cada concentração.

3.6 Histoquímica e Imunohistoquímica

Após a pletismografia, os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico 33% (Crystália, São Paulo, Brasil; 0,2 mL, ip), traqueostomizados com catéter intravascular 20G e sacrificados por dissecação da aorta abdominal. Os pulmões foram coletados e insuflados com 0,3 mL de formol 4% através da cânula traqueal e foram imersos na mesma solução por 24 horas. Após a fixação, o tecido pulmonar foi cortado longitudinalmente no pulmão esquerdo (lobos superior e médio) e transversalmente no pulmão direito (lobos superior e médio). O material foi processado de acordo com a rotina de técnica histológica por meio de inclusão em parafina e seção em micrótomo convencional (espessura dos cortes - 5 µm).

Para a análise morfométrica, as lâminas foram analisadas utilizando-se um retículo de 50 retas e 100 pontos, acoplado à objetiva do microscópio óptico convencional. A área total do retículo em aumento de 1000X corresponde a 10.000 μm^2 enquanto que o comprimento é de 2.500 μm^2 .

Inflamação peribrônquica

Densidade de eosinófilos e linfócitos

Para quantificar os eosinófilos e linfócitos presentes no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular (entre a via aérea e o vaso adjacente) as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina.

O retículo foi ancorado na membrana basal da via aérea, focada a um aumento de 1000X e foram quantificados o número de pontos que caíram sobre o infiltrado inflamatório e o número de eosinófilos ou linfócitos presentes neste espaço. A relação entre o número de células e a área de infiltrado configura a densidade de células inflamatórias. Foram mensuradas 5 vias aéreas por lâmina.

Densidade de macrófagos

Para quantificar os macrófagos presentes no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular, os cortes de pulmão foram desparafinizados e hidratados. Após bloqueio com peroxidase endógena, a recuperação do antígeno foi realizada com tampão citrato (pH=6) em temperatura alta. Os macrófagos foram marcados com anticorpo monoclonal de rato IgG2a anti MAC-2 de camundongo, na diluição 1:10000 (Clone M3/38; Cedarlane Laboratories, Ontário, Canadá).

A densidade de macrófagos foi quantificada da mesma maneira que a de eosinófilos e linfócitos.

Avaliação do epitélio das vias aéreas

Para avaliação do epitélio das vias aéreas, as lâminas foram coradas com uma combinação de Ácido Periódico de Shiff (PAS) e Azul Alciano (AB) em pH = 2,5 para detecção de mucinas ácidas e neutras e identificação de células com muco armazenado.

Quantificação das células epiteliais e mucosubstâncias intraepiteliais

A quantificação de mucosubstâncias neutras e ácidas foi realizada ancorando o retículo na membrana basal da via aérea a ser analisada no aumento de 1000X. O volume de muco (ácido ou neutro) se deu pelo número de pontos que caíram sobre muco armazenado no interior da célula secretora na superfície epitelial dividido pelo comprimento da membrana basal. A área ocupada por células secretoras ou ciliadas foi determinada pelo número de pontos que incidiram sobre cada tipo de célula dividido pela área total de epitélio (número de pontos totais). Foram contados 10 campos/lâmina.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat 3.11 (Systat Software Inc, CA, USA).

Utilizamos a análise de variância de 2 fatores (inflamações induzidas por OVA e/ou ROFA no experimento I, linhagens e inflamação induzida pela OVA no experimento II, linhagens e inflamação induzida pela ROFA no experimento III).

Para comparação entre os grupos foi utilizado o método de Holm-Sidak. Foi considerada diferença significativa quando o valor de p foi menor que 0,05.

Os resultados serão apresentados em histogramas, como média $\pm$ erro padrão.

RESULTADOS

4 . RESULTADOS

4.1 *EXPERIMENTO I*

Com o objetivo de estudar os efeitos pulmonares da administração intranasal de material particulado proveniente da queima de óleo diesel em camundongos da linhagem BALB/c e identificar possíveis amplificações da resposta inflamatória alérgica induzida pela sensibilização alérgica a ovalbumina (OVA), realizamos o Experimento I.

Para analisarmos a responsividade pulmonar à metacolina, optamos por utilizar pletismografia de corpo inteiro, calculando o Penh, um índice de broncoconstrição (Figura 5) e comparando as áreas obtidas sob a curva dose-resposta à metacolina para cada um dos grupos estudados. Notamos que os animais sensibilizados com ovalbumina (OVA+SAL) apresentaram maior responsividade pulmonar do que os animais não sensibilizados (SAL+SAL) ($p<0,001$). A administração de ROFA levou a um aumento da responsividade em animais não sensibilizados (SAL+ROFA) ($p=0,004$), além de amplificar a responsividade nos animais previamente sensibilizados por ovalbumina (OVA+ROFA) ($p=0,043$) (Figura 6).

Para comprovarmos a eficiência do nosso modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida pela ovalbumina, quantificamos histologicamente a inflamação peribroncovascular. Observamos nos animais sensibilizados

por ovalbumina (OVA+SAL) um intenso infiltrado inflamatório ao redor das vias aéreas e vasos adjacentes (Figura 4).

Figura 4. Fotomicrografias de pulmões de camundongos BALB/c corados com HE, aumento de 200 X. Painel Superior – animal controle (SAL+SAL). Painel Inferior - animal sensibilizados por ovalbumina e SAL in (OVA+SAL)

Figura 5. Penh (índice de broncoconstrição) obtido após administração de metacolina (Mch) inalatória em concentrações crescentes em camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA).

Figura 6. Área sob a curva de Penh obtida após administração de concentrações crescentes de metacolina inalatória em camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). ** $p=0,004$ e * $p<0,001$ se comparados ao grupo SAL+SAL; # $p=0,043$ se comparado ao grupo sensibilizado (OVA+SAL).

Ao quantificarmos a densidade de eosinófilos presentes no infiltrado inflamatório (Figura 7) notamos que os animais sensibilizados com ovalbumina (OVA+SAL) apresentaram maior densidade de eosinófilos do que os animais não sensibilizados (SAL+SAL) ($p<0,001$). A administração intranasal de ROFA não elevou a quantidade de eosinófilos nos animais não sensibilizados (SAL+ROFA) assim como não apresentou efeito aditivo ao recrutamento de eosinófilos nos animais previamente sensibilizados por OVA (OVA+SAL).

Neste infiltrado inflamatório encontramos também um aumento na densidade de linfócitos (Figura 8) nos animais sensibilizados por ovalbumina (OVA+SAL) quando comparados aos animais não sensibilizados (SAL+SAL) ($p=0,04$). Não houve recrutamento linfocitário induzido pela administração de ROFA nos animais não sensibilizados (SAL+ROFA) bem como efeito aditivo da co-administração no recrutamento de linfócitos nos animais sensibilizados por OVA (OVA+ROFA).

Ao investigarmos os macrófagos presentes no espaço peribroncovascular (Figura 9), notamos um aumento na densidade de macrófagos nos animais sensibilizados por OVA (OVA+SAL) ($p<0,001$) e ausência de ação ou interação da administração de ROFA neste recrutamento (SAL+ROFA e OVA+ROFA, respectivamente).

Figura 7. Densidade de eosinófilos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p < 0,001$ se comparado ao grupo SAL+SAL.

Figura 8. Densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p=0,04$ se comparado ao grupo SAL+SAL.

Figura 9. Densidade de macrófagos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p < 0,001$ se comparado ao grupo SAL+SAL.

Além do infiltrado inflamatório, outro componente importante estudado foi o remodelamento epitelial nas vias aéreas destes animais. Ao observarmos as fotomicrografias dos pulmões corados com PAS-AB, notamos alterações significativas entre os grupos estudados (Figura 10).

Figura 10. Fotomicrografias de pulmões de camundongos BALB/c corados com PAS-AB, aumento 100X. Painel superior – animal controle (SAL+SAL). Painel Inferior - animal sensibilizados por ovalbumina que receberam SAL in (OVA+SAL)

Analizamos primeiramente a área epitelial de cada um dos grupos estudados (Figura 11). Notamos que os animais sensibilizados por ovalbumina (OVA+SAL) apresentaram um espessamento do epitélio das vias aéreas se comparados aos animais controle (SAL+SAL) ($p=0,003$). A administração de ROFA não alterou a área epitelial dos animais não sensibilizados (SAL+ROFA) e não teve efeito aditivo no espessamento provocado pela OVA (OVA+ROFA).

Quantificamos também a área ocupada por células secretoras de muco e células ciliadas. Notamos uma diminuição significativa na área ocupada por células ciliadas (Figura 12) nos animais com inflamação crônica induzida por ovalbumina ($p<0,001$) se comparada ao grupo controle (SAL+SAL). A administração de ROFA em animais não sensibilizados (SAL+ROFA) também levou a uma redução na área de células ciliadas ($p=0,006$). Além disso, foi observado nos animais que receberam a ROFA após a inflamação provocada pela OVA (OVA+ROFA) um efeito aditivo àquele provocado apenas pela inflamação crônica induzida por OVA ($p=0,017$).

Figura 11. Área epitelial nas vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p=0,003$ se comparado ao grupo SAL+SAL.

Figura 12. Área ocupada por células ciliadas (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) nas vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p < 0,001$ e ** $p = 0,006$ se comparados ao grupo SAL+SAL, # $p = 0,04$ se comparado ao grupo OVA+SAL.

Ao analisarmos as células secretoras de muco (Figura 13), observamos que os animais com inflamação crônica induzida por OVA (OVA+SAL) apresentaram um aumento significativo da área ocupada por esse tipo celular se comparado ao grupo controle (SAL+SAL) ($p<0,001$). Notamos ainda que a administração de ROFA não desencadeia alterações nas células secretoras (SAL+ROFA), assim como não amplifica este fenômeno observado nos animais inflamados por OVA (OVA+ROFA).

Quantificamos também o volume de muco armazenado nas células secretoras presentes no epitélio das vias aéreas (Figuras 14 e 15). Observamos que os animais com inflamação crônica de vias aéreas (OVA+SAL) apresentaram uma maior quantidade de muco armazenado que os animais controle (SAL+SAL), seja esse muco ácido ou neutro ($p=0,04$ e $p<0,001$, respectivamente). A administração de ROFA não alterou o volume de muco em animais sensibilizados por OVA assim como em camundongos não sensibilizados.

Figura 13. Área ocupada por células secretoras de muco (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) nas vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p < 0,001$ se comparados ao grupo SAL+SAL.

Figura 14. Volume de muco ácido armazenado em células secretoras (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) das vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p=0,04$ se comparados ao grupo SAL+SAL.

Figura 15. Volume de muco neutro armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos BALB/c controle (SAL+SAL), que receberam ROFA in (SAL+ROFA), sensibilizados por OVA (OVA+SAL), e sensibilizados por OVA e que receberam ROFA in (SAL+ROFA). * $p < 0,001$ se comparados ao grupo SAL+SAL.

4.2 EXPERIMENTO II

Com o objetivo de estudar diferenças na resposta inflamatória alérgica induzida pela sensibilização alérgica a ovalbumina (OVA) em camundongos selecionados para máxima resposta inflamatória aguda, AIR, (AIRmax) e mínima AIR (AIRmin), realizamos o Experimento II.

Calculamos o Penh obtido após a inalação de doses crescentes de metacolina (Figura 17) e comparamos as áreas obtidas sob essas curvas para cada um dos grupos estudados. Notamos que os animais com inflamação alérgica crônica induzida por ovalbumina (MAX OVA e MIN OVA) apresentaram maior responsividade pulmonar do que os animais controle (MAX SAL e MIN SAL) ($p=0,028$), não houve diferença entre as respostas obtidas nos camundongos AIRmax e AIRmin (Figura 18).

Para compararmos a inflamação pulmonar alérgica induzida pela ovalbumina, analisamos histologicamente a inflamação peribroncovascular. Observamos nos animais com inflamação alérgica induzida por ovalbumina (OVA) um intenso infiltrado inflamatório ao redor das vias aéreas e vasos adjacentes (Figura 16) em ambas as linhagens estudadas.

Figura 16. Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin corados com HE, aumento de 100X. Painel A – animal AIRmax controle (MAX SAL). Painel B - animal AIRmax sensibilizados por ovalbumina (MAX OVA) Painel C - animal AIRmin controle (MIN SAL), e Painel D – animal AIRmin sensibilizados por ovalbumina (MIN OVA).

Figura 17. Penh (índice de broncoconstrição) obtido após administração de concentrações crescentes de metacolina (Mch) inalatória em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por ovalbumina (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por ovalbumina (MIN OVA).

Figura 18. Área sob a curva de Penh obtida após administração de metacolina inalatória em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por ovalbumina (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por ovalbumina (MIN OVA). * $p=0,028$, se comparados aos grupos controle.

Ao quantificarmos a densidade de eosinófilos presentes no infiltrado inflamatório (Figura 19) notamos que os animais com inflamação alérgica induzida por ovalbumina (MAX OVA e MIN OVA) apresentaram maior densidade de eosinófilos ($p < 0,001$) que os animais não sensibilizados (MAX SAL e MIN SAL). Embora não haja diferença estatisticamente significativa na densidade de eosinófilos entre as linhagens, os camundongos da linhagem AIRmin (MIN OVA) que foram sensibilizados por OVA apresentaram uma maior densidade de eosinófilos ($p = 0,016$), se comparados aos sensibilizados da linhagem AIRmax (MAX OVA).

Neste infiltrado inflamatório encontramos também um aumento na densidade de linfócitos (Figura 20) nos animais sensibilizados por ovalbumina (MAX OVA e MIN OVA) quando comparados aos animais não sensibilizados (MAX SAL E MIN SAL) ($p = 0,013$). Não houve interação entre o recrutamento linfocitário induzido pela administração de OVA e as linhagens de camundongo estudadas.

Ao investigarmos os macrófagos presentes no espaço peribroncovascular (Figura 21), notamos um aumento na densidade de macrófagos nos animais com inflamação alérgica induzida por OVA (MAX OVA e MIN OVA) ($p < 0,001$), se comparados aos seus respectivos controles (MAX SAL e MIN SAL). Este aumento ocorreu igualmente em ambas as linhagens estudadas.

Figura 19. Densidade de eosinófilos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p < 0,001$ se comparado aos grupos controle, ** $p = 0,016$ se comparado ao sensibilizado AIRmax (MAX OVA).

Figura 20. Densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p=0,013$ se comparado aos grupos controle.

Figura 21. Densidade de macrófagos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p < 0,001$, se comparado aos grupos controle.

Além do infiltrado inflamatório, outro componente importante estudado foi o remodelamento epitelial nas vias aéreas destes animais. Ao observarmos as fotomicrografias dos pulmões corados com PAS-AB, notamos alterações significativas entre os grupos estudados (Figura 22).

Figura 22. Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin corados com PAS-AB, aumento 200X. Painel A – animais AIRmax controle (MAX SAL). Painel B - animais AIRmin controle (MIN SAL), Painel C - animais AIRmax sensibilizados por ovalbumina (MAX OVA) e Painel D – animais AIRmin sensibilizados por ovalbumina (MIN OVA).

Analizamos primeiramente a área epitelial de cada um dos grupos estudados (Figura 23). Notamos que os animais com inflamação alérgica induzida por ovalbumina (MAX OVA e MIN OVA) apresentaram um espessamento do epitélio das vias aéreas se comparado aos animais controle (MAX SAL e MIN SAL) ($p=0,001$). As linhagens estudadas apresentaram respostas semelhantes.

Quantificamos também a área ocupada por células secretoras de muco e células ciliadas. Notamos uma diminuição significativa na área ocupada por células ciliadas (Figura 24) nos animais com inflamação crônica induzida por ovalbumina ($p<0,001$) se comparada aos grupos controle (MAX SAL e MIN SAL). Não houve diferença entre as duas linhagens estudadas.

Ao analisarmos as células secretoras de muco (Figura 25), observamos que os animais com inflamação crônica induzida por OVA (MAX OVA e MIN OVA) apresentaram um aumento significativo da área ocupada por esse tipo celular se comparada aos grupos controle (MAX SAL e MIN SAL) ($p<0,001$). Para este parâmetro, não houve diferença entre as linhagens estudadas.

Figura 23. Área epitelial das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p < 0,001$, se comparado aos grupos controle.

Figura 24. Área ocupada por células ciliadas (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p < 0,001$, se comparado aos grupos controle.

Figura 25. Área ocupada por células secretoras de muco (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) nas vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL), AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA).
* $p < 0,001$, se comparado aos grupos controle.

Quantificamos também o volume de muco produzido e armazenado nas células secretoras presentes no epitélio das vias aéreas (Figuras 26 e 27). Observamos que os animais com inflamação de vias aéreas induzida pela OVA (MAX OVA E MIN OVA) apresentaram uma maior quantidade de muco armazenado quando comparado aos animais controle (MAX SAL e MIN SAL), seja esse muco ácido ou neutro ($p=0,002$ e $p<0,001$, respectivamente). O fator linhagem não apresentou diferença entre as respostas.

Figura 26. Volume de muco ácido armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p=0,002$, se comparado aos grupos controle.

Figura 27. Volume de muco neutro armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax sensibilizados por OVA (MAX OVA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin sensibilizados por OVA (MIN OVA). * $p < 0,001$, se comparado aos grupos controle.

4.3 EXPERIMENTO III

Com o objetivo de estudar diferenças na resposta inflamatória alérgica induzida pela administração intranasal de material particulado (ROFA) em camundongos selecionados para máxima resposta inflamatória aguda, AIR, (AIRmax) e mínima AIR (AIRmin), realizamos o Experimento III.

Calculamos o Penh obtido após a inalação de doses crescentes de metacolina (Figura 29) e comparamos as áreas obtidas sob essas curvas para cada um dos grupos estudados (Figura 30). Notamos que os animais da linhagem AIRmin apresentaram maior responsividade que os animais AIRmax ($P=0,006$). A exposição a ROFA levou a uma maior responsividade apenas nos animais AIRmin (MIN ROFA) ($p=0,033$ se comparado ao MIN SAL e $p=0,002$ se comparado ao MAX ROFA).

Para compararmos a inflamação pulmonar alérgica induzida pela exposição a ROFA, analisamos histologicamente a inflamação peribroncovascular. Observamos nos animais expostos ao material particulado (ROFA) um discreto infiltrado inflamatório, principalmente macrofágico ao redor das vias aéreas e vasos adjacentes (Figura 28) principalmente na linhagem AIRmax.

Figura 28. Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin corados com HE, aumento de 200X. Painel A – animal AIRmax controle (MAX SAL). Painel B - animal AIRmax expostos a ROFA (MAX ROFA), Painel C – animal AIRmin controle (MIN SAL). Painel D - animal AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA)

Figura 29. Penh (índice de broncoconstrição) obtido após administração de doses crescentes de metacolina (Mch) inalatória em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos a material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin exposto a ROFA (MIN ROFA).

Figura 30. Área sob a curva de Penh obtida após administração de metacolina inalatória em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ao material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin exposto a ROFA (MIN ROFA). * $p=0,033$ se comparado ao grupo MIN SAL; ** $p=0,002$ se comparado ao grupo MAX ROFA e # $p=0,006$ se comparada a linhagem AIRmin com a linhagem AIRmax.

Ao quantificarmos a densidade de eosinófilos presentes no infiltrado inflamatório (Figura 31) notamos que a exposição a níveis ambientais de material particulado não elevou o número de eosinófilos em nenhuma das duas linhagens estudadas. Embora não haja diferença estatística na densidade de eosinófilos entre as linhagens, os camundongos da linhagem AIRmax apresentaram uma forte tendência a uma maior densidade eosinofílica no espaço peribroncovascular que os animais AIRmin ($p=0,059$).

Não houve aumento na densidade de linfócitos (Figura 32) nos animais expostos ao material particulado (MAX ROFA e MIN ROFA) quando comparadas aos animais não expostos (MAX SAL E MIN SAL), em ambas as linhagens de camundongo estudadas.

Ao investigarmos os macrófagos presentes no espaço peribroncovascular (figura 33), notamos um aumento na densidade de macrófagos nos animais expostos a ROFA (MAX ROFA e MIN ROFA) ($p=0,033$), se comparados aos seus respectivos controles (MAX SAL e MIN SAL). Não houve diferença nesta resposta em ambas linhagens estudadas, embora os animais da linhagem AIRmax expostos a ROFA (MAX ROFA) apresentaram uma tendência a uma maior densidade macrofágica ($p=0,072$).

Figura 31. Densidade de eosinófilos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos a ROFA (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA).

Figura 32. Densidade de linfócitos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ROFA (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA).

Figura 33. Densidade de macrófagos no infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular nas vias aéreas em camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos a ROFA (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA). * $p < 0,033$, se comparado aos grupos controle.

Além do infiltrado inflamatório, outro componente estudado foi o remodelamento epitelial nas vias aéreas destes animais. Ao observarmos as fotomicrografias dos pulmões corados com PAS-AB, notamos alterações significativas entre os grupos estudados (Figura 34).

Figura 34. Fotomicrografias de pulmões de camundongos AIRmax e AIRmin corados com PAS-AB, aumento 200X. Painel A – animais AIRmax controle (MAX SAL). Painel B - animais AIRmin controle (MIN SAL), Painel C - animais AIRmax sensibilizados por ovalbumina (MAX OVA) e Painel D – animais AIRmin sensibilizados por ovalbumina (MIN OVA).

Analizamos primeiramente a área epitelial de cada um dos grupos estudados (Figura 35). Não observamos espessamento do epitélio das vias aéreas nos animais expostos ao material particulado (MAX ROFA e MIN ROFA).

Quantificamos então a área ocupada por células secretoras de muco e células ciliadas. Notamos uma diminuição significativa na área ocupada por células ciliadas (Figura 36) nos animais expostos a ROFA ($p < 0,001$) se comparada aos grupos controle (MAX SAL e MIN SAL). Não houve diferença entre as duas linhagens estudadas.

Ao analisarmos as células secretoras de muco (Figura 37), observamos que os animais expostos a ROFA (MAX ROFA e MIN ROFA) apresentaram um aumento significativo da área ocupada por esse tipo celular se comparada aos grupos controle (MAX SAL e MIN SAL) ($p < 0,001$). Para este parâmetro, não houve diferença entre as linhagens estudadas.

Figura 35. Área epitelial nas vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ao material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA).

Figura 36. Área ocupada por células ciliadas (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ao material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA). * $p < 0,001$ se comparados aos grupos controle (MAX SAL e MIN SAL).

Figura 37. Área ocupada por células secretoras de muco (dividido pelo comprimento da membrana basal – MB) nas vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ao material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA). * $p < 0,001$, se comparado aos grupos controle (MAX SAL e MIN SAL).

Quantificamos também o volume de muco produzido e armazenado nas células secretoras presentes no epitélio das vias aéreas (Figuras 38 e 39). Observamos que 48 horas após a exposição a níveis ambientais de material particulado, os animais não apresentaram aumento no volume de muco armazenado nas duas linhagens estudadas, apesar de ambas as linhagens apresentarem um aumento de células secretoras após a exposição a ROFA.

Figura 38. Volume de muco ácido armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ao material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA).

Figura 39. Volume de muco neutro armazenado em células secretoras das vias aéreas de camundongos AIRmax controle (MAX SAL), AIRmax expostos ao material particulado (MAX ROFA), AIRmin controle (MIN SAL) e AIRmin expostos a ROFA (MIN ROFA)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A utilização de modelos desenvolvidos em pequenos animais com inflamação pulmonar alérgica crônica tem fornecido informações importantes sobre os mecanismos imunes e inflamatórios da asma (59-61).

Um dos mais antigos modelos animais de resposta alérgica é em cobaias, com estudos conduzidos há mais de 100 anos (62). Em nosso laboratório, Tibério e colaboradores (63) começaram a estudar modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina na década de 90, utilizando cobaias que recebiam doses crescentes de aerossol de ovalbumina. Este modelo ainda é usado em diversos experimentos, reproduzindo diversos aspectos fisiopatológicos da asma humana, como intenso infiltrado inflamatório com linfócitos CD4⁺ e eosinófilos ao redor das vias aéreas, presença de broncoconstrição e aumento de resistência do sistema respiratório. Entretanto, existem algumas limitações desse modelo experimental, como a fragilidade destes animais, alto custo, e a indisponibilidade de anticorpos comerciais e manipulação genética.

Atualmente, os modelos murinos de asma são os mais utilizados para o estudo de resposta pulmonar alérgica. Os camundongos são a espécie ideal para se estudar a maioria das doenças por já existir conhecimento

detalhado de sua genética (64), por ser fácil de se manipular por tecnologia genética (65), por existirem diversas sondas camundongo-específicas disponíveis comercialmente para estudos de desfechos alérgicos, além de serem animais relativamente baratos, especialmente quando grandes estudos são conduzidos.

Em 2000, Kasahara e colaboradores (66) padronizaram novo modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica sensibilizando camundongos BALB/c com ovalbumina importada e clara de ovo liofilizada nacional na sensibilização. Com este trabalho mostraram que a ovalbumina nacional induzia inflamação pulmonar mais intensa a um custo infinitamente menor. A partir daí, diversos trabalhos têm sido realizados utilizando este modelo experimental (67, 68).

A sensibilização dos camundongos pode ser realizada por injeção intraperitoneal do alérgeno (sensibilização ativa e sistêmica) ou por exposição local ao alérgeno, geralmente em combinação com o adjuvante. Nestes modelos, há uma resposta inflamatória eosinofílica característica que é dependente da produção de citocinas do tipo Th2 (69). Após o desafio local de alérgeno (pulmonar), estes camundongos sensibilizados foram avaliados para o fenótipo asmático e apresentaram hiperresponsividade de vias aéreas, inflamação pulmonar, elevação de imunoglobulinas séricas, especialmente imunoglobulina E antígeno-específica (IgE) e IgG (40, 43, 48, 70) e remodelamento de vias aéreas, incluindo o espessamento de

membrana basal, mudanças epiteliais, fibrose subepitelial, aumento de massa do músculo liso e alterações na vascularização da mucosa de vias aéreas (34, 70). Törmänen e colaboradores (70) mostraram um aumento na proliferação de células brônquicas epiteliais e eosinofilia peribrônquica e perivascular induzidos por desafios de OVA. Tanaka e colaboradores (34) demonstraram que a exposição prolongada ao antígeno pode induzir remodelamento de vias aéreas associado com hiperresponsividade brônquica em camundongos sensibilizados, incluindo deposição de colágeno abaixo da membrana basal e hiperplasia/hipertrofia de células secretoras.

No presente estudo, avaliamos o efeito da inflamação pulmonar alérgica crônica induzida pela ovalbumina utilizando camundongos BALB/c e observamos que a exposição à OVA levou a um intenso infiltrado inflamatório no espaço peribroncovascular, caracterizado pela presença de macrófagos, eosinófilos e linfócitos. Encontramos, também, um intenso remodelamento epitelial nos camundongos com inflamação alérgica crônica induzida pela OVA, com espessamento epitelial, substituição de células ciliadas por secretoras e aumento na quantidade de muco armazenado, tanto ácido como neutro. Além disso, houve um aumento marcante na responsividade pulmonar à metacolina nesses animais.

Por haver diferentes linhagens de camundongos, e por estas apresentarem diferenças substanciais em sua responsividade intrínseca aos agentes broncoconstritores e na habilidade de induzir as respostas alérgicas

(71), decidimos estudar linhagens diferentes. AIRmax (resposta inflamatória aguda máxima) e AIRmin (resposta inflamatória aguda mínima) são duas linhagens de camundongos que diferem substancialmente na resposta inflamatória (neutrofílica) aguda não-específica. Estas linhagens foram produzidas por seleção fenotípica da prole gerada por cruzamento de oito linhagens de camundongos isogênicos. As linhagens resultantes (AIRmax e AIRmin) mostraram diferença de 10 a 15 vezes no número de neutrófilos no infiltrado e a uma diferença 2,5 vezes na concentração da proteína no exudato inflamatório induzido por grânulos de poliacrilamida injetados no subcutâneo (50).

A seleção baseada em fenótipo genético representa uma alternativa aos animais geneticamente manipulados e talvez reflita melhor a situação da população humana.

Maria e colaboradores (72) observaram que os camundongos AIRmin apresentavam uma maior susceptibilidade aos adenomas pulmonares induzidos pelo uretano quando comparados aos camundongos AIRmax. Em contraste, Araújo e colaboradores (52) mostraram que os camundongos AIRmax têm uma maior suscetibilidade às infecções experimentais induzidas por *Salmonella Typhimurium* e *Listeria*. Vigar e colaboradores (53) estudaram artrite experimental induzida por pristane em camundongos AIRmax e AIRmin e observaram que os animais AIRmax desenvolveram mais artrite. Foi observado um maior número de células secretoras de IL-6,

TNF- α e IL-4 no baço de camundongos AIRmax e mais células produtoras de IFN- γ no baço de animais AIRmin, sugerindo que o padrão genético dos camundongos AIRmax suscetíveis à artrite favorece uma resposta Th2.

Na fase tardia da asma, além dos eosinófilos, os neutrófilos também exercem um papel importante na resposta asmática tardia, produzindo uma imensa gama de substâncias, incluindo citocinas, proteases, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Os produtos neutrofílicos podem causar estreitamento de vias aéreas, aumento da secreção de muco e elevação da responsividade do músculo liso ao redor das vias aéreas (73). Desta forma, nossos experimentos em camundongos AIRmax e AIRmin podem avaliar os efeitos dos neutrófilos nesta resposta.

Entretanto, nestas linhagens de camundongo, a resposta inflamatória subaguda ou crônica ainda não está definida completamente. Assim, realizamos experimentos utilizando estas linhagens de camundongos para estudar a resposta a um estímulo agudo (ROFA) e a indução de inflamação alérgica crônica pulmonar por ovalbumina.

O experimento realizado em animais AIRmax e AIRmin expostos à OVA para o desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica crônica mostrou resultados semelhantes àqueles obtidos com os animais BALB/c. Ambas as linhagens apresentaram intenso infiltrado inflamatório ao redor das vias aéreas e vasos adjacentes, com eosinófilos, macrófagos e

linfócitos. Porém, os animais AIRmin com inflamação pulmonar alérgica crônica apresentaram infiltrado inflamatório eosinofílico mais denso que os animais inflamados AIRmax.

A responsividade à metacolina também se mostrou elevada nos animais com inflamação pulmonar crônica induzida pela OVA. No entanto, não houve diferença neste parâmetro entre as linhagens estudadas.

Além disso, os animais AIRmax e AIRmin com inflamação alérgica crônica induzida por OVA apresentaram intenso remodelamento epitelial nas vias aéreas, com espessamento de epitélio, substituição de células ciliadas por células secretoras de muco e aumento significativo nos volumes de mucos ácido e neutro armazenados.

As alterações epiteliais encontradas em ambos os experimentos são semelhantes àsquelas encontradas por outros autores que estudaram modelos murinos de asma embora nenhum deles tenha avaliado o epitélio de forma tão complexa, quantificando os diversos tipos celulares e a quantidade de mucos ácidos e neutros. Blyth e colaboradores (74) estudaram camundongos com inflamação pulmonar induzida por OVA e observaram espessamento epitelial e hiperplasia de células secretoras nos bronquíolos terminais e grandes vias aéreas. Krinzman e colaboradores (75) sugeriram que a metaplasia de células secretoras e o infiltrado inflamatório estariam associados à ativação de linfócitos T, mediando a inflamação

pulmonar alérgica e a reatividade brônquica. Tomkinson e colaboradores (33) observaram aumento significativo na hiperplasia de células secretoras e na produção de muco em camundongos BALB/c apenas 96 horas após o último desafio com OVA e associaram este aumento a uma maior concentração de IL-4 e IL-13 no lavado bronco alveolar.

As citocinas IL-4 e IL-13 aumentaram a produção de TGF- α em cultura de células epiteliais provenientes de vias aéreas de pacientes asmáticos (76). O TGF- α , ativado via receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), é um potente estímulo para a metaplasia de células secretoras epiteliais. Isso ajuda a explicar porque as células em cultura na presença de IL-4 ou IL-13 diferenciam-se em células secretoras na presença de meio ar-líquido (77).

O aumento de morbidade em pessoas que sofrem de doenças inflamatórias pulmonares, tais como a asma e a bronquite, foi associado às partículas da poluição de ar. Uma das hipóteses para explicar este feito seria que as partículas inaláveis poderiam causar uma amplificação da inflamação pulmonar associada a estas doenças, piorando assim os sintomas do indivíduo afetado (36). Os estudos epidemiológicos sugerem que os asmáticos são mais sensíveis aos efeitos do material particulado do que as pessoas saudáveis (27). Embora os mecanismos pelos quais o material particulado venha a desencadear efeitos adversos na saúde ainda sejam

mal compreendidos, a composição química da partícula parece ter um papel importante na toxicidade (78).

A cinza residual da queima de óleo (ROFA) e outras cinzas particuladas são produtos da combustão do óleo e contêm sulfatos e metais de transição solúveis. A ROFA tem sido utilizada como um substituto de partículas de poluição ambiental do ar, uma vez que é rica em metais de transição e sua composição pode ser precisamente determinada. A ROFA pode causar a lesão epitelial de vias aéreas e inflamação pulmonar através de lesão oxidante metal-dependente, indução de expressão de citocinas (49) e estimulação da produção de prostaglandinas (79-82).

A ROFA utilizada em nosso estudo foi proveniente da caldeira movida a óleo diesel que se encontra na lavanderia do Hospital Universitário da USP. Na sua composição encontram-se diversos metais, principalmente metais de transição. Administramos 60 µg de ROFA por via intranasal por 4 dias não-consecutivos. Calculamos essa dosagem de forma a mimetizar a concentração de material particulado que um camundongo respiraria por dia, morando na cidade de São Paulo.

A administração intranasal de ROFA em camundongos BALB/c não sensibilizados elevou a responsividade pulmonar à metacolina e acarretou diminuição da área ocupada por células ciliadas. Em camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin não sensibilizados e expostos a ROFA

observamos alterações mais significativas, com remodelamento epitelial caracterizado por substituição de células ciliadas por secretoras no epitélio das vias aéreas, presença de infiltrado macrofágico no espaço entre vias aéreas e vasos adjacentes. Esta resposta epitelial a ROFA não foi influenciada pelo background genético dos camundongos, uma vez que não observamos diferenças significativas na resposta a ROFA quando AIRmax, AIRmin foram comparados. Porém, no que diz respeito à responsividade pulmonar, observamos que os animais da linhagem AIRmin mostraram-se mais susceptíveis aos efeitos secundários da instilação intranasal de ROFA do que os AIRmax.

Dye e colaboradores (80) estudaram a citotoxicidade da ROFA em cultura de células epiteliais e sugerem que as lesões epiteliais encontradas se devem a estresse oxidativo, envolvendo a produção de radical hidroxila e superóxidos, por via independente de óxido nítrico. Em outro estudo, Dye e colaboradores (83) mostraram que a exposição de células traqueais de rato a ROFA leva a uma maior síntese de IL-6 e MIP-2.

Outro estudo em cultura de células traqueais de cobaia sugere que os efeitos citotóxicos provém do aumento da carga oxidativa e depleção das defesas anti-oxidantes pelos metais de transição presentes na ROFA (84).

Ohta e colaboradores (85) estudaram camundongos das linhagens A/J e C57BL/6 expostos a partículas da exaustão de diesel e sugerem que o aumento da responsividade pulmonar esteja ligado à síntese de GM-CSF.

Camargo Pires-Neto e colaboradores (86) avaliaram as alterações nas vias aéreas superiores de camundongos induzidas pela exposição ao material particulado da poluição atmosférica da cidade de São Paulo. Observaram que os camundongos expostos à poluição apresentam maior quantidade de muco ácido armazenado nas células secretoras epiteliais, prejudicando os mecanismos de defesa do trato respiratório.

A influência da administração de ROFA em modelos experimentais de asma foi estudada previamente, usando protocolos experimentais diferentes (32, 36, 39, 48, 49). Em um modelo experimental usando camundongos jovens sensibilizados com OVA e co-expostos a aerossol de ROFA, Hamada e colaboradores (48) observaram que a ROFA aumentou a responsividade de vias aéreas nos camundongos sensibilizados com OVA e a quantidade de células inflamatórias (neutrófilos e eosinófilos) no lavado broncoalveolar em 24 horas mas não 48 horas após a administração.

Em animais não-sensibilizados, nenhum efeito marcante foi observado. Gavett e colaboradores (49) usaram um único desafio do ovalbumina em camundongos sensibilizados e administraram uma única dose intratraqueal de ROFA uma a três horas depois do desafio de OVA e observaram que a

ROFA potencializou o aumento dos eosinófilos no BAL induzido pelo desafio de OVA. Além disso, o aumento da responsividade pulmonar à metacolina induzido pelo desafio de OVA foi maior nos camundongos que também receberam ROFA.

Goldsmith e colaboradores (36) sensibilizaram camundongos neonatos BALB/c com ovalbumina e os submeteram a três desafios de OVA nos dias 21, 22 e 23. Co-expuseram ao aerossol de ROFA no dia 22. Os animais que receberam OVA e ROFA apresentaram uma responsividade pulmonar mais elevada à metacolina, mas não houve alteração no número de eosinófilos no BAL, se comparados aos camundongos que receberam somente OVA. Em nosso estudo, nós avaliamos o infiltrado eosinofílico no tecido pulmonar, 48 horas após o último desafio e não observamos efeito da administração de ROFA no infiltrado eosinofílico em nenhuma das linhagens de camundongo estudadas.

O efeito aditivo da exposição a ROFA encontrados nos camundongos com inflamação alérgica crônica parece estar relacionado à atividade oxidativa dos metais de transição nela presentes. Animais tratados com antioxidantes como DMTU (48, 80), vitamina E e n-propil galato (87) tiveram os efeitos da ROFA revertidos.

Os três estudos supracitados expuseram os animais a sobrenadante de solução de ROFA (ROFA-s), em concentração muito superior àquela utilizada em nosso estudo.

Em nosso estudo sobre a interação da administração da ROFA na resposta inflamatória induzida pela exposição à OVA em camundongos BALB/c, notamos uma amplificação da responsividade à metacolina nos animais co-expostos. Não houve alteração na inflamação ou remodelamento epitelial.

Uma possível explicação para a ausência de alterações nos outros parâmetros estudados seja o alto grau de inflamação induzido pela exposição à OVA nos camundongos BALB/c, com remodelamento epitelial e intenso infiltrado inflamatório ao redor das vias aéreas e vasos adjacentes, rico em eosinófilos, linfócitos e macrófagos, tornando difícil a detecção de alterações adicionais geradas pela administração de ROFA.

Para as medidas de responsividade a metacolina, utilizamos a pletismografia em animal livre para movimentação e analisamos os valores médios de Penh obtidos após inalação de doses crescentes de metacolina. Optamos por utilizar este método nessa tese uma vez que a pletismografia de corpo inteiro em animais livres para movimentação têm sido amplamente utilizada na literatura nos últimos anos.

Em 1997, Hamelmann e colaboradores (57) propuseram que a relação entre os picos de pressão expiratória e inspiratória multiplicado pela pausa (relação entre o tempo expiratório e o tempo de relaxamento) seria um índice de broncoconstrição denominado “pausa aumentada” ou Penh. A nova técnica oferecia diversas vantagens em relação às técnicas invasivas existentes até então, como a possibilidade de diversas medidas em um mesmo animal, ausência da interferência de anestesia e traqueostomia, possibilidade de estudos temporais com a avaliação do animal por diversas horas ou até dias.

A partir de então, diversos estudos foram realizados com diversas espécies animais utilizando-se desta nova metodologia, sendo que alguns deles mostraram inconsistência entre os valores obtidos pela pletismografia e com aqueles obtidos por técnicas invasivas, utilizando anestesia geral e traqueostomia ou intubação traqueal (88-93). Em 2002, Lundblad e colaboradores publicaram trabalho onde são criticadas as medidas feitas por pletismografia em câmara única, como a usada na medida de Penh, pois há uma importante interdependência entre o volume mensurado e a qualidade do ar presente nesta câmara. As medidas só seriam válidas se o ar fosse pré-condicionado e se a capacidade residual funcional e o volume pulmonar fossem medidos independentemente (94). Em 2006, Lomask apresentou argumentos teóricos e matemáticos sobre o porquê da validade das medidas realizadas por pletismografia. Justificou que os problemas de condicionamento de ar afetariam muito pouco as medidas de Penh, pois o

equipamento trabalha com pletismógrafo não vedado e o transdutor de pressão a ele acoplado estaria medindo na verdade alterações de fluxo dentro da caixa (95). Com a polêmica criada, diversas cartas têm sido enviadas aos editores cobrando maior cautela no aceite de trabalhos que utilizem esse índice em substituição a medidas de resistência das vias aéreas (96, 97).

A hiperresponsividade é uma das mais proeminentes características da asma. Embora sua causa ainda não esteja bem estabelecida, os dados dos nossos estudos sugerem a poluição do ar piore a hiperresponsividade pulmonar.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A administração intranasal da cinza residual da queima de óleo diesel (ROFA) amplifica a hiperresponsividade pulmonar induzida pela inflamação pulmonar alérgica embora não atue no remodelamento e na inflamação epitelial. A administração de ROFA isolada induz remodelamento epitelial e hiperresponsividade pulmonar (EXPERIMENTO I);

A eosinofilia induzida pela sensibilização à ovalbumina se mostrou mais intensa nos camundongos selecionados para mínima resposta inflamatória aguda, AIR (AIRmin), se comparados aos animais selecionados para máxima resposta, AIR, (AIRmax). Não houve diferenças entre as linhagens quando analisados a hiperresponsividade pulmonar e o remodelamento epitelial (EXPERIMENTO II);

A hiperresponsividade induzida pela administração intranasal de ROFA mostrou-se mais intensa nos camundongos selecionados para mínima resposta inflamatória aguda (AIRmin). A ROFA induziu remodelamento epitelial semelhante em ambas as linhagens estudadas. (EXPERIMENTO III).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. NIH. Global Initiative for Asthma. 2006 [cited 2007 03 de Setembro de 2007]; Available from: www.ginasthma.org.br
2. Schroder NW, Maurer M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy*. 2007 Jun;62(6):579-90.
3. Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, et al. 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 Dec 7;188(11):2019-31.
4. Holgate ST, Finnerty JP. Recent advances in understanding the pathogenesis of asthma and its clinical implications. *Q J Med*. 1988 Jan;66(249):5-19.
5. Yoshida M, Watson RM, Rerecich T, O'Byrne PM. Different profiles of T-cell IFN-gamma and IL-12 in allergen-induced early and dual responders with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May;115(5):1004-9.
6. Bergen R, Black S, Shinefield H, Lewis E, Ray P, Hansen J, et al. Safety of cold-adapted live attenuated influenza vaccine in a large cohort of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Feb;23(2):138-44.

7. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:749-86.
8. Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol*. 2004 Sep;25(9):477-82.
9. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Mar;111(3):450-63; quiz 64.
10. Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2004 Dec;16(6):702-8.
11. Peters-Golden M. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Jul;31(1):3-7.
12. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003 Dec;33(12):1622-8.
13. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J*. 2000 May;15(5):961-8.
14. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy*. 2004 Nov;59(11):1139-52.

15. Black JL. Asthma--more muscle cells or more muscular cells? *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 1;169(9):980-1.
16. McParland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol*. 2003 Jul;95(1):426-34.
17. Wang L, McParland BE, Pare PD. The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):356S-62S.
18. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):350-62.
19. Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Neller AH, Best TL, Petroeschevsky AL, et al. Air pollution and child respiratory health: a case-crossover study in Australia and New Zealand. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jun 1;171(11):1272-8.
20. Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, et al. Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Feb;113(2):303-6.
21. Anto JM, Soriano JB, Sunyer J, Rodrigo MJ, Morell F, Roca J, et al. Long term outcome of soybean epidemic asthma after an allergen reduction intervention. *Thorax*. 1999 Aug;54(8):670-4.

22. Chen LL, Tager IB, Peden DB, Christian DL, Ferrando RE, Welch BS, et al. Effect of ozone exposure on airway responses to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Chest*. 2004 Jun;125(6):2328-35.
23. Marks GB, Colquhoun JR, Girgis ST, Koski MH, Treloar AB, Hansen P, et al. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax*. 2001 Jun;56(6):468-71.
24. Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, et al. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Apr;117(4):824-30.
25. Barrett EG, Rudolph K, Bowen LE, Muggenburg BA, Bice DE. Effect of inhaled ultrafine carbon particles on the allergic airway response in ragweed-sensitized dogs. *Inhal Toxicol*. 2003 Feb;15(2):151-65.
26. Peden DB. Air pollution in asthma: effect of pollutants on airway inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001 Dec;87(6 Suppl 3):12-7.
27. Schildcrout JS, Sheppard L, Lumley T, Slaughter JC, Koenig JQ, Shapiro GG. Ambient air pollution and asthma exacerbations in children: an eight-city analysis. *Am J Epidemiol*. 2006 Sep 15;164(6):505-17.
28. Epstein MM. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol*. 2004 Jan;133(1):84-100.

-
29. Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol*. 2006 Jun;57 Suppl 2:41-4.
 30. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jul;37(7):973-88.
 31. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy*. 1994 Jan;24(1):73-80.
 32. Hamada K, Goldsmith CA, Goldman A, Kobzik L. Resistance of very young mice to inhaled allergen sensitization is overcome by coexposure to an air-pollutant aerosol. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Apr;161(4 Pt 1):1285-93.
 33. Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, Larson KA, Lee JJ, Gelfand EW. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163(3 Pt 1):721-30.
 34. Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S, Komai M, Nagao K, Takahashi Y, et al. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res*. 2001 Dec;50(12):616-24.
 35. Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Barger MW, Roberts JR, et al. Exposure of brown Norway rats to diesel exhaust particles prior to ovalbumin

- (OVA) sensitization elicits IgE adjuvant activity but attenuates OVA-induced airway inflammation. *Toxicol Sci.* 2005 Nov;88(1):150-60.
36. Goldsmith CA, Hamada K, Ning Y, Qin G, Catalano P, Krishna Murthy GG, et al. Effects of environmental aerosols on airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Inhal Toxicol.* 1999 Nov;11(11):981-98.
37. Steerenberg PA, van Dalen WJ, Withagen CE, Dormans JA, van Loveren H. Optimization of route of administration for coexposure to ovalbumin and particle matter to induce adjuvant activity in respiratory allergy in the mouse. *Inhal Toxicol.* 2003 Nov;15(13):1309-25.
38. Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Wu ZX, Barger MW, et al. Effect of diesel exhaust particles on allergic reactions and airway responsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. *Toxicol Sci.* 2005 Nov;88(1):202-12.
39. Lambert AL, Dong W, Selgrade MK, Gilmour MI. Enhanced allergic sensitization by residual oil fly ash particles is mediated by soluble metal constituents. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 May 15;165(1):84-93.
40. 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 Aug;141(2):223-9.

-
41. Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Aug;281(2):L394-402.
 42. Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Jul;285(1):L32-42.
 43. Ichinose T, Takano H, Sadakane K, Yanagisawa R, Yoshikawa T, Sagai M, et al. Mouse strain differences in eosinophilic airway inflammation caused by intratracheal instillation of mite allergen and diesel exhaust particles. *J Appl Toxicol*. 2004 Jan-Feb;24(1):69-76.
 44. Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15;168(8):959-67.
 45. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. 2003 Aug;22(2):374-82.
 46. Hao M, Comier S, Wang M, Lee JJ, Nel A. Diesel exhaust particles exert acute effects on airway inflammation and function in murine allergen provocation models. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5):905-14.
 47. de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine carbon black particles cause early airway inflammation and have adjuvant activity in a mouse allergic airway disease model. *Toxicol Sci*. 2005 Oct;87(2):409-18.

-
48. 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 Oct 15;58(3):129-43.
 49. Gavett SH, Madison SL, Stevens MA, Costa DL. Residual oil fly ash amplifies allergic cytokines, airway responsiveness, and inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Dec;160(6):1897-904.
 50. Ibanez OM, Mouton D, Oliveira SL, Ribeiro Filho OG, Piatti RM, Sant'Anna OA, et al. Polygenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. *Immunogenetics*. 1988;28(1):6-12.
 51. Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WH, Morisset J, et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol*. 2003 Oct;74(4):497-506.
 52. Araujo LM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, et al. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol*. 1998 Sep;28(9):2913-20.
 53. Vigar ND, Cabrera WH, Araujo LM, Ribeiro OG, Ogata TR, Siqueira M, et al. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol*. 2000 Feb;30(2):431-7.

-
54. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998 Feb;19(2):337-46.
 55. Ribeiro OG, Cabrera WH, Maria DA, De Franco M, Massa S, Di Pace RF, et al. Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. *Exp Lung Res*. 2005 Jan-Feb;31(1):105-16.
 56. Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WH, Barrera RG, et al. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas1) locus affects inflammatory response. *Oncogene*. 2003 Jan 23;22(3):426-32.
 57. Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):766-75.
 58. Halloy DJ, Kirschvink NA, Vincke GL, Hamoir JN, Delvaux FH, Gustin PG. Whole body barometric plethysmography: a screening method to investigate airway reactivity and acute lung injuries in freely moving pigs. *Vet J*. 2004 Nov;168(3):276-84.
 59. Pauwels RA, Brusselle GJ, Kips JC. Cytokine manipulation in animal models of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Oct;156(4 Pt 2):S78-81.

60. Herz U, Lumpp U, Da Palma JC, Enssle K, Takatsu K, Schnoy N, et al. The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. *Immunol Cell Biol.* 1996 Apr;74(2):209-17.
61. Emala C, Hirshman C. Animal models of bronchial hyperreactivity. *Monogr Allergy.* 1996;33:35-52.
62. Karol MH. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J.* 1994 Mar;7(3):555-68.
63. Tiberio IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocinio M, et al. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 May;155(5):1739-47.
64. Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature.* 1996 Mar 14;380(6570):149-52.
65. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest.* 2003 Feb;111(3):291-7.
66. Kasahara DIC, F.M.A. ; MARTINS, M.A. ; NUNES, M.P.T. . Infamação pulmonar crônica: comparação entre ovalbumina nacional e importada. Reunião anual da FeSBE; 2003; Pinhais - PR - BR; 2003.

67. Kasahara DI. B2-agonista como imunomodulador da resposta inflamatória pulmonar crônica induzida em camundongos sensibilizados com ovoalbumina. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.
68. Vieira RP, Duarte AC, Claudino RC, Perini A, Santos AB, Moriya HT, et al. Creatine Supplementation Exacerbates Allergic Lung Inflammation and Airway Remodeling in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Jul 19.
69. Hussain I, Randolph D, Brody SL, Song SK, Hsu A, Kahn AM, et al. Induction, distribution and modulation of upper airway allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2001 Jul;31(7):1048-59.
70. Tormanen KR, Uller L, Persson CG, Erjefalt JS. Allergen exposure of mouse airways evokes remodeling of both bronchi and large pulmonary vessels. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan 1;171(1):19-25.
71. Bice DE, Seagrave J, Green FH. Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol*. 2000 Sep;12(9):829-62.
72. Maria DA, Ribeiro OG, Pizzocaro KF, De Franco M, Cabrera WK, Starobinas N, et al. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. *Carcinogenesis*. 2001 Feb;22(2):337-42.

73. Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest*. 2001 May;119(5):1329-36.
74. Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 May;14(5):425-38.
75. Krinzman SJ, De Sanctis GT, Cernadas M, Kobzik L, Listman JA, Christiani DC, et al. T cell activation in a murine model of asthma. *Am J Physiol*. 1996 Sep;271(3 Pt 1):L476-83.
76. Lordan JL, Bucchieri F, Richter A, Konstantinidis A, Holloway JW, Thornber M, et al. Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2002 Jul 1;169(1):407-14.
77. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):193-204.
78. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jun 15;165(12):1610-7.

79. Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Oct;146(2):180-8.
80. Dye JA, Adler KB, Richards JH, Dreher KL. Epithelial injury induced by exposure to residual oil fly-ash particles: role of reactive oxygen species? *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Nov;17(5):625-33.
81. Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, et al. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999 Sep;104(6):721-32.
82. Samet JM, Reed W, Ghio AJ, Devlin RB, Carter JD, Dailey LA, et al. Induction of prostaglandin H synthase 2 in human airway epithelial cells exposed to residual oil fly ash. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Nov;141(1):159-68.
83. Dye JA, Adler KB, Richards JH, Dreher KL. Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 1):L498-510.
84. Jiang N, Dreher KL, Dye JA, Li Y, Richards JH, Martin LD, et al. Residual oil fly ash induces cytotoxicity and mucin secretion by guinea pig tracheal epithelial cells via an oxidant-mediated mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 Mar 15;163(3):221-30.

-
85. Ohta K, Yamashita N, Tajima M, Miyasaka T, Nakano J, Nakajima M, et al. Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in a murine model: essential role of GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov;104(5):1024-30.
 86. Camargo Pires-Neto R, Julia Lichtenfels A, Regina Soares S, Macchione M, Hilario Nascimento Saldiva P, Dolhnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. 2006 Jul;101(3):356-61.
 87. Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PH. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Res*. 2005 Jul;98(3):349-54.
 88. Albertine KH, Wang L, Watanabe S, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Temporal correlation of measurements of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Jul;283(1):L219-33.
 89. Flandre TD, Leroy PL, Desmecht DJ. Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *J Appl Physiol*. 2003 Mar;94(3):1129-36.
 90. Petak F, Habre W, Donati YR, Hantos Z, Barazzzone-Argiroffo C. Hyperoxia-induced changes in mouse lung mechanics: forced oscillations vs. barometric plethysmography. *J Appl Physiol*. 2001 Jun;90(6):2221-30.

91. 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 Jul;97(1):286-92.
92. DeLorme MP, Moss OR. Pulmonary function assessment by whole-body plethysmography in restrained versus unrestrained mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2002 Jan-Feb;47(1):1-10.
93. Pauluhn J. Comparative analysis of pulmonary irritation by measurements of Penh and protein in bronchoalveolar lavage fluid in brown Norway rats and Wistar rats exposed to irritant aerosols. *Inhal Toxicol*. 2004 Mar;16(3):159-75.
94. Lundblad LK, Irvin CG, Adler A, Bates JH. A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. *J Appl Physiol*. 2002 Oct;93(4):1198-207.
95. Lomask M. Further exploration of the Penh parameter. *Exp Toxicol Pathol*. 2006 Jun;57 Suppl 2:13-20.
96. Lundblad LK, Irvin CG, Hantos Z, Sly P, Mitzner W, Bates JH. Penh is not a measure of airway resistance! *Eur Respir J*. 2007 Oct;30(4):805.
97. Bates J, Irvin C, Brusasco V, Drazen J, Fredberg J, Loring S, et al. The use and misuse of Penh in animal models of lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Sep;31(3):373-4.