ALESSANDRA CHOQUETA DE TOLEDO

**Desenvolvimento de um modelo experimental *in vivo*
para o estudo do clearance mucociliar em camundongos
normais e com inflamação de vias aéreas:
estudo do efeito de medicamentos
utilizados no tratamento da asma**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Toledo, Alessandra Choqueta de

Desenvolvimento de um modelo experimental “in vivo” para o estudo do clearance mucociliar em camundongos normais e com inflamação de vias aéreas : estudo do efeito de medicamentos utilizados no tratamento da asma /
Alessandra Choqueta de Toledo. -- São Paulo, 2005.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Milton de Arruda Martins.

Descritores: 1.MODELOS ANIMAIS 2.ASMA 3.DEPURAÇÃO MUCOCILIAR
4.BRONCODILATADORES 5.MUCO 6.MUCOSA RESPIRATÓRIA

USP/FM/SBD-310/05

DEDICATÓRIA

A Deus, meu guia espiritual.

A meus pais João Batista de Toledo e Tereza Choqueta de Toledo, pela presença e exemplo em minha vida.

A minha irmã Fabíola, estudante que inicia a caminhada pela pesquisa e a todos os iniciantes. As dificuldades surgem durante a caminhada ao mesmo tempo em que a satisfação e o prazer em caminhar crescem.

Ao Junior, companheiro de muitas escaladas e caminhadas, que vem nos ensinando que permitir o crescimento do outro, apesar da distância física, na verdade nos faz mais próximos.

AGRADECIMENTOS

Agora, ao final da escalada, olho para trás e vejo que cheguei até aqui com a ajuda de inúmeras pessoas que gostaria de agradecer neste momento.

Mas antes disso vou contar um pouco sobre como tudo começou – seguindo a orientação do meu guia, Prof. Milton, que um dia me disse “...conte uma história”.

Aqui vai...

Antes dessa escalada, outras experiências de caminhadas, me motivaram a ousadia de enfrentá-la. As primeiras caminhadas iniciaram-se durante a graduação em Fisioterapia na UNESP, caminhadas longas pela busca do conhecimento, muitos amigos, filosofias, brincadeiras, período da vida que parece interminável, mas que um dia fica para trás com muitas histórias para contar. E lá se foram quatro anos de acampamentos guiados pela Profa. Ercy. Mochila nas costas, rumo a UNICAMP, onde mais um grupo me esperava para novas atividades, desta vez um pouco mais específicas. Percorremos uma longa trilha e pude adquirir experiências novas e conhecer um pouco mais sobre montanhismo com o guia Prof. Renato G.G. Terzi, o que me fez olhar com interesse as montanhas tecnicamente mais complexas. A partir daí, mochila nas costas novamente e material técnico para enfrentar lugares inóspitos e clima rigoroso, saí de Campinas e bati às portas da USP, onde já havia estado durante a graduação. Era primavera de 2001, época propícia para início da preparação para a escalada. Chegando ao Abrigo “Poluição

atmosférica” fui recebida pelos guias Geraldo Lorenzi Filho (Gegê) e Mariangela Macchione, e pelas hoje amigas Regiane Oliveira e Claudia Yagi, que juntos, ensinaram-me as técnicas fundamentais de escalada em rocha. Neste período, conheci duas companheiras de cordada, Luciana e Andréia, companheiras inseparáveis nos meus treinamentos e investidas de aclimatação em ambiente de ar rarefeito. Logo tive a oportunidade e privilégio de conhecer e conviver com o prof. Paulo Saldiva, escalador e ciclista, que mesmo inicialmente sem muitos recursos vem levando seu grupo a se destacar entre os melhores do mundo. Aprendi com ele que um guia deve ser capaz de ousar, com responsabilidade, e de motivar os participantes a atingirem os seus objetivos, pois só assim o grupo chega ao topo. "E força lá..." Neste período, estava à procura de um guia que pudesse me orientar e de preferência liderar a minha cordada. Quando já estava em intenso treinamento, o guia Gegê, que havia me recebido e com quem aprendi principalmente técnicas de segurança na pedra, apresentou-me a outro guia, dizendo ser este o homem que levaria a ponta da corda, guiando-me até o cume desta montanha: o Prof. Mílton de Arruda Martins, experiente guia de alta montanha que gentilmente aceitou ser meu parceiro de cordada. Durante todo este período aprendi com ele que mais do que agregar idéias e torna-las praticáveis, um bom guia agrega pessoas. Imediatamente iniciamos as investidas com a companhia da escaladora Fernanda Arantes para montagem dos acampamentos avançados, acima do acampamento base. Além de muito receptiva e

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP:

Bolsa de Mestrado: Processo 02/11330-7

EPÍGRAFE

***“A felicidade não é uma estação de chegada,
mas um modo de viajar”***

M. Ruberck

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.....	2
2 OBJETIVOS	6
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
3.1 Considerações sobre o transporte mucociliar	8
3.2 Batimento ciliar	13
3.3 Transporte iônico do epitélio respiratório	15
3.4 Acoplamento mucociliar.....	20
3.5 Asma	21
3.6 Transporte mucociliar na asma.....	25
3.7 Remodelamento das vias aéreas.....	28
3.8 Modelos experimentais de asma	33
3.9 Medicamentos utilizados no tratamento da asma.....	35
3.10 Modelos experimentais para o estudo do transporte mucociliar.....	39
4 MÉTODOS.....	43
4.1 Protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar .	43
4.2 Grupos experimentais	46
4.3 Mensuração da frequência de batimento ciliar <i>in vivo</i>	47
4.4 Mensuração da diferença de potencial transepitelial	50
4.5 Lavado broncoalveolar	52
4.6 Análise histológica da cavidade nasal, traquéia e pulmão	53

4.7 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO.....	74
7 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EPITÉLIO RESPIRATÓRIO MOSTRANDO QUE O NÚMERO DE CÍLIOS POR CÉLULA DECRESCER À MEDIDA QUE SE APROXIMA O TERRITÓRIO DE TROCA GASOSA (MODIFICADA DE FISHMANN)	10
FIGURA 2 - ESQUEMA MOSTRANDO A ESTRUTURA CILIAR EM CORTE TRANSVERSAL ENVOLTO PELA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA CONTÍNUA À CÉLULA. OBSERVA-SE NOVE PARES DE MICROTUBULOS PERIFÉRICOS CONECTADOS ENTRE SI POR PONTES DE NEXINA E DISPOSTOS AO REDOR DE UM PAR CENTRAL.....	11
FIGURA 3 - VISÃO LATERAL MOSTRANDO AS DUAS CAMADAS QUE COMPÕEM O MUCO E A ZONA DE PENETRAÇÃO DOS CÍLIOS NA EPIFASE GEL (MODIFICADO DE MACCHIONE E COLS, 1998).....	12
FIGURA 4 - VISÃO LATERAL DO BATIMENTO CILIAR EM SUAS FASES DE BATIMENTO EFETIVO PARA DIREITA E DE RECUPERAÇÃO PARA ESQUERDA (MODIFICADO DE LORENZI, 1992).....	14
FIGURA 5 - MECANISMOS DE ABSORÇÃO (A) E SECREÇÃO (B) DE ÍONS, ÁGUA E ELETRÓLITOS DO EPITÉLIO RESPIRATÓRIO. (TJ: TIGHT-JUNCTION) (MODIFICADO DE LORENZI, 1994).	18
FIGURA 6 - ESQUEMA DO PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO COM OVOALBUMINA.	45
FIGURA 7 - ESQUEMA DO PROTOCOLO DOS ANIMAIS CONTROLE.....	45
FIGURA 8 - EQUIPAMENTO PARA MENSURAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR	48
FIGURA 9 - IMAGEM DO EPITÉLIO RESPIRATÓRIO TRAQUEAL DE CAMUNDONGO GERADA PELO MONITOR.....	48
FIGURA 10 - EQUIPAMENTO PARA MENSURAÇÃO DA DIFERENÇA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL.....	51
FIGURA 11 - VALORES (MÉDIAS ± ERRO PADRÃO) DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC), BASAIS E APÓS INALAÇÃO DE SOLUÇÃO SALINA 0,9% POR 15 MINUTOS, DE ACETILCOLINA NA CONCENTRAÇÃO DE 10^{-3} M POR 15 MINUTOS E CAPSAICINA 3.10^{-9} M POR 5 MINUTOS. *P=0,014, SE COMPARADO AO BASAL.....	58
FIGURA 12 - VALORES BASAIS (MÉDIAS ± ERRO PADRÃO) DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC), DE ANIMAIS CONTROLE E COM INFLAMAÇÃO DE VIAS AÉREAS (OVA).....	59

FIGURA 13 - VALORES (MÉDIAS ± ERRO PADRÃO) BASAIS E APÓS INALAÇÃO DE SALBUTAMOL NAS CONCENTRAÇÕES DE $3,5 \cdot 10^{-3}$ M E $3,5 \cdot 10^{-4}$ M, DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC) DE ANIMAIS CONTROLE E COM INFLAMAÇÃO DE VIAS AÉREAS (OVA) (* P<0,05).....	60
FIGURA 14 - VALORES (MÉDIAS ± ERRO PADRÃO) DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC), DE ANIMAIS CONTROLE E COM INFLAMAÇÃO DE VIAS AÉREAS (OVA), BASAIS E APÓS INALAÇÃO DE IPRATRÓPIO NAS CONCENTRAÇÕES 10^{-4} M E $6 \cdot 10^{-4}$ M.	61
FIGURA 15 - MÉDIA DOS VALORES DA DIFERENÇA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL MEDIDOS NA TRAQUÉIA DE CAMUNDONGOS CONTROLE E SENSIBILIZADOS COM OVOALBUMINA (OVA) (*P = 0,013).	62
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA MOSTRANDO AS <i>TIGHT JUNCTIONS</i> (SETAS) EM TRAQUÉIA DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLE (A) E COM INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE VIAS AÉREAS (B).....	63
FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA MOSTRANDO AS <i>TIGHT JUNCTIONS</i> (SETAS) EM TRAQUÉIA DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLE (A) E COM INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE VIAS AÉREAS (B),.....	64
FIGURA 18 - CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PRESENTES NO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	65
FIGURA 19 - OS ANIMAIS DO GRUPO OVA APRESENTAM UM AUMENTO SIGNIFICATIVO DE CÉLULAS SECRETORAS E MUCINAS ÁCIDAS NA CAVIDADE NASAL COMPARADO AO GRUPO CONTROLE.	66
FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DA CAVIDADE NASAL DE CAMUNDONGOS (COLORAÇÃO PAS/AB) (AUMENTO DE 1000X) DOS GRUPOS CONTROLE (A) E COM INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE VIAS AÉREAS (B).67	67
FIGURA 21 - OS ANIMAIS OVA APRESENTAM UM AUMENTO SIGNIFICATIVO DE CÉLULAS SECRETORAS E MUCINAS NEUTRAS NA TRAQUÉIA COMPARADO AO CONTROLE.....	68
FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE TRAQUÉIA DE CAMUNDONGOS (COLORAÇÃO PAS/AB) (AUMENTO DE 1000X) DOS GRUPOS CONTROLE (A) E COM INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE VIAS AÉREAS (B).....	69
FIGURA 23 - OS ANIMAIS OVA APRESENTAM UM AUMENTO SIGNIFICATIVO DE CÉLULAS SECRETORAS E MUCINAS ÁCIDAS E NEUTRAS NAS VIAS AÉREAS DISTAIS COMPARADO AO CONTROLE.	70
FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS (COLORAÇÃO PAS/AB) (AUMENTO DE 200X) DOS GRUPOS CONTROLE (A) E COM INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE VIAS AÉREAS (B).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Morbidade Hospitalar do SUS – por local de internação – Brasil (Período: Julho/2005)	24
--	----

RESUMO

Toledo AC. Desenvolvimento de um modelo experimental *in vivo* para o estudo do clearance mucociliar em camundongos normais e com inflamação de vias aéreas: estudo do efeito de medicamentos utilizados no tratamento da asma. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 127p.

O objetivo do presente trabalho foi propiciar o acesso *in vivo* ao epitélio respiratório e estudar a frequência de batimento ciliar (FBC) e a diferença de potencial transepitelial (DP) em um modelo murino de doença alérgica das vias aéreas induzida por ovoalbumina. Camundongos Swiss foram sensibilizados com ovoalbumina (OVA) através de duas injeções intraperitoneais de alérgico com o adjuvante hidróxido de alumínio (dias 0 e 14) e quatro inalações de OA 1% (dias 22, 24, 26 e 28). O grupo controle (S) foi tratado com salina 0,9 % seguindo o mesmo protocolo. Após 48h da última inalação, os camundongos foram anestesiados, a traquéia foi exposta longitudinalmente (1x4 mm) e o epitélio pode ser visualizado. A FBC foi mensurada pela técnica estroboscópica antes (basal) e logo após a administração inalatória das drogas (salbutamol e brometo de ipratrópio). A DP foi mensurada nos grupos S e OVA. Foram avaliados o lavado broncoalveolar e o remodelamento do epitélio da cavidade nasal, traquéia e vias aéreas distais. Nenhuma diferença foi encontrada na FBC basal entre os grupos (OVA e S), no entanto o grupo OVA mostrou uma DP basal significativamente menor. A inalação de salbutamol ($3.5 \cdot 10^{-3}M$ ou $3.5 \cdot 10^{-4}M$) elevou a FBC nos grupos estudados ($p < 0,05$). O brometo de ipratrópio ($10^{-4}M$) elevou a FBC nos grupos estudados ($p < 0,05$). O brometo de ipratrópio ($10^{-4}M$) elevou a DP nos grupos estudados ($p < 0,05$).

4M e 6.10^{-4}M) não influenciou a FBC basal. Nossos resultados mostraram que é possível avaliar a FBC e a DP *in vivo* em um modelo murino de doença pulmonar alérgica crônica, e indicam que o processo inflamatório não afeta a FBC, mas contribui para o aumento de muco nas vias aéreas com conseqüências deletérias ao transporte mucociliar facilitando a retenção.

Descritores: modelos animais; asma; depuração mucociliar; broncodilatadores; muco; mucosa respiratória.

SUMMARY

Toledo AC. *In vivo* evaluation of the airway epithelium in a murine model of allergic airway disease: effects of inhalatory drugs on ciliary beat frequency. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 127p.

The aim of the present work was to propitiate the *in vivo* assessment of the respiratory epithelium. The effects of salbutamol and ipratropium bromide on ciliary beat frequency (CBF) in a murine model of allergic airway disease were addressed. Transepithelial electric potential difference (PD) was also measured in order to verify the integrity of the epithelial barrier. Mice were sensitized with ovalbumin (OVA) by two intraperitoneal injections of allergen (days 0 and 14) and four inhalations of OVA 1% (days 22, 24, 26 and 28). The control group was treated with saline following the same procedures. After 48 hs of the last inhalation, mice were anesthetized, trachea was opened longitudinally (1 x 4 mm) and the ciliated epithelium could be visualized. CBF was measured by a modification on the videoscopic technique. We measured the CBF before and just after the administration of aerosolized substances. The PD was also measured on groups OVA and S. Additionally, the eosinophil cell count was measured on broncoalveolar lavage (BAL) in order to access the magnitude of airway inflammation. No difference on baseline CBF was noticed between groups (OVA and S), however the OVA group had a significantly lower PD. The administration of aerosolized capsaicin ($3 \cdot 10^{-9} \text{M}$) and salbutamol ($3.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ or $3.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$) increased CBF in all groups studied. Ipratropium bromide (10^{-4}M and $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$)

⁴M) did not influence the CBF. The eosinophil cell count in bronchoalveolar lavage was higher in OVA group compared to S group. CBF and PD results indicate that the inflammatory process does not affect the ciliary beat frequency but augments the amount of mucus in the airway, with deleterious consequences to the mucociliary transport facilitating mucus retention. Our results demonstrated for the first time the possibility of studying airway epithelium in an *in vivo* murine model of allergic airway disease.

Keywords: animal models; asthma; clearance mucociliary; airway epithelium; bronchodilators; mucus; airway epithelium.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica de vias aéreas cuja prevalência vem aumentando nas últimas décadas. Essa doença acomete pessoas de qualquer faixa etária, todas as etnias e classes sociais de todo mundo. O gasto anual com as internações por asma no Brasil está em torno de 76 milhões de reais, o que representa o terceiro maior valor de gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) em todo o país com uma doença. Sob o ponto de vista clínico, pode manifestar-se através de simples episódios de tosse até dispnéia severa podendo determinar a morte.

A asma fatal é caracterizada pelo remodelamento das vias aéreas, infiltrado eosinofílico e neutrofílico, contração da musculatura lisa e acúmulo de muco na luz das vias aéreas (James, 2005). James e Carrol, em 1995, mostraram que a presença de muco na luz da via aérea pode aumentar substancialmente a sua resistência ao fluxo aéreo mesmo em graus leves de contração do músculo liso brônquico.

Ao mesmo tempo em que ocorre descamação intensa de células para dentro da luz da via aérea, há prejuízo da ciliogênese, com redução do número de cílios por célula epitelial (Lundgren, 1977).

Buys, 1984, mostrou que a peroxidase eosinofílica (EPO) tem uma estrutura semelhante à mieloperoxidase e na presença de H_2O_2 , cloreto, brometo ou iodeto apresenta atividade citotóxica contra vários organismos. É capaz de inativar leucotrienos, é tóxica para o epitélio brônquico e pode também causar paralização ciliar (Motojima, 1989).

O transporte mucociliar envolve três funções genéricas: geração de força, função secretora e transporte de água e íons, sendo que qualquer falha nessas funções é suficiente para comprometimento desse transporte.

O cílio é o motor fundamental desse sistema de transporte, apesar da sua importância poucos trabalhos realizados *in vivo* estudaram a frequência de batimento ciliar na asma.

A inflamação alérgica das vias aéreas pode afetar o transporte epitelial de água e íons, medido pela diferença de potencial transepitelial, que é um importante marcador da interação muco-cílio.

Os medicamentos que são utilizados para o tratamento da asma podem interferir tanto na composição do muco como na frequência de batimento ciliar, podendo ter efeito significativo sobre o transporte mucociliar. Entretanto, os trabalhos em que o efeito desses medicamentos foi investigado de forma sistemática em modelos experimentais de asma e/ou *in vivo* são em número reduzido.

Nas últimas décadas, muitos modelos experimentais de asma foram produzidos pela inalação de antígenos apropriados, o que possibilitou estudar o processo fisiopatológico da asma, bem como os efeitos da sua intervenção terapêutica. Estas pesquisas têm o intuito de reduzir a morbidade e a mortalidade dessa doença, que pode ser incapacitante, e que traz prejuízos pessoais e profissionais aos seus portadores (Booth BH, 1970; Khai e Huston 2001; Kips e cols 2003).

Assim, fica evidente a necessidade de estudar os fatores determinantes do transporte mucociliar, normal e patológico, em situação

mais próxima aquela existente, *in vivo*, de forma a poder contribuir para a compreensão da doença.

Neste contexto, faremos uma breve revisão sobre o sistema mucociliar e os fatores determinantes para o seu funcionamento.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram, portanto:

- 1) Desenvolver um modelo experimental em camundongo para o estudo *in vivo* da frequência de batimento ciliar.
- 2) A partir do desenvolvimento desse modelo, estudar a frequência de batimento ciliar e a diferença de potencial transepitelial no epitélio traqueal de animais controle e animais com inflamação alérgica crônica de vias aéreas, induzida por ovoalbumina.
- 3) Estudar o efeito do salbutamol e do ipratrópio, medicamentos utilizados no tratamento da asma, sobre a frequência de batimento de ciliar de camundongos controle e com inflamação de vias aéreas.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações sobre o transporte mucociliar

A extensa superfície epitelial do trato respiratório entre o nariz e o alvéolo está exposta diariamente a uma grande carga de partículas orgânicas e inorgânicas e materiais gasosos com ações potencialmente danosas, por isso, uma série de sistemas de defesa estão envolvidos na sua proteção.

O aparelho mucociliar da árvore traqueobrônquica é a primeira linha de defesa do sistema respiratório. Ele é responsável pela depuração das partículas inaladas que se depositam na camada de muco que recobre a superfície epitelial. A eficiência mecânica deste sistema de transporte depende, portanto, da integridade e do movimento coordenado dos cílios, das propriedades físicas do muco (Puchelle e cols, 1980) e da interação entre cílio e muco.

O muco que reveste as vias aéreas é composto por duas fases: uma epifase gel, mais viscosa, descontínua, secretada pelas glândulas mucosas e pelas células caliciformes do epitélio e uma hipofase sol, de menor viscosidade, contínua desde a traquéia até os bronquíolos, produzida pelas células serosas e células de Clara do epitélio.

A camada de muco que reveste as vias aéreas possui uma espessura de dois a cinco micrômetros. O muco é uma mistura complexa e heterogênea de células, fluído, transudato e proteínas produzidas localmente, e de glicoproteínas, formando um polímero hidrofílico, onde 95%

do seu conteúdo é aquoso; 1% é composto por constituintes dialisáveis e 4% é constituído por macromoléculas – glicoproteínas, proteínas e lipídeos (Lopes-Vidriero, 1981). A camada de muco que reveste o epitélio respiratório serve para conduzir as partículas nocivas que são inaladas, e devem possuir características reológicas adequadas para melhor aproveitamento da energia cinética fornecida pelo batimento ciliar. Além disso, possui também importante atividade antimicrobiana e neutralizadora de agentes químicos nocivos (Saldiva, 1990).

As células ciliadas possuem forma colunar, apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bastante desenvolvidos, numerosas mitocôndrias concentradas no ápice da célula próximas aos corpúsculos basais e núcleo no pólo inferior da célula.

As células ciliadas da traquéia de humanos possuem cerca de 200 a 250 cílios/célula, os quais medem cerca de 0,25 micrômetros de espessura; são cerca de 1,5 a 2 milhões de cílios por centímetro quadrado de mucosa traqueobrônquica (Lopez-Vidriero e Reid, 1978).

O número de cílios por célula decresce à medida que se aproxima o território de troca gasosa (Figura 1). Serafini e Michaelson 1977, encontraram em células obtidas da árvore traqueobrônquica de humanos, 56% de células ciliadas na traquéia e apenas 15% na quinta geração brônquica. O comprimento ciliar médio era de 6,3 μm na traquéia e 3,6 μm na sexta geração brônquica.

Existe uma velocidade de transporte ciliar tanto maior quanto mais proximal for a via aérea analisada. Esta diferença de velocidade minimiza a possibilidade de retenção de secreção nos brônquios (Lorenzi e cols, 1992).

Figura 1 - Epitélio respiratório mostrando que o número de cílios por célula decresce à medida que se aproxima o território de troca gasosa (Modificada de Fishmann)

O cílio é um prolongamento citoplasmático e sua estrutura é constante no reino animal. Em corte transversal apresentam nove pares de microtubulos periféricos e um par central.

Figura 2 - Esquema mostrando a estrutura ciliar em corte transversal envolto pela membrana citoplasmática contínua à célula. Observa-se nove pares de microtubulos periféricos conectados entre si por pontes de nexina e dispostos ao redor de um par central.

O batimento ciliar se dá de tal forma que o topo do cílio bata na fase gel na ida, impelindo-a a progredir em direção mais proximal, e na volta, o cílio retorna pela fase sol, de modo a despende menor quantidade de energia (Figura 2) (Baum e cols, 1998). Assim, o muco é propelido em direção à laringe pelo batimento coordenado dos cílios do epitélio das vias aéreas.

Figura 3 - Visão lateral mostrando as duas camadas que compõem o muco e a zona de penetração dos cílios na epifase gel (modificado de Macchione e cols, 1998).

As células ciliadas e secretoras são as mais relevantes relacionadas ao transporte mucociliar. Existem atualmente dez tipos celulares descritos no epitélio respiratório, incluindo-se células com papel ainda pouco conhecido (Jeffery e cols, 1983).

3.2 Batimento ciliar

O movimento ciliar é pendular e com frequência normal de batimento de 10 a 20 Hz. Existem situações que podem dificultar o movimento ciliar como substâncias irritantes (fumo, SO₂, NO₂, ozônio), medicamentos (sedativos), alterações estruturais das vias aéreas (bronquiectasia), modificações nas propriedades físicas do muco (infecção, desidratação) e hipersecreção de muco.

A propulsão do fluido brônquico pelos cílios é conseguida pelo fato do batimento ciliar ser assimétrico. O ciclo completo do batimento ciliar pode ser decomposto em duas fases: uma fase de batimento efetivo, na qual o cílio alcança a sua extensão máxima, penetra a sua extremidade na epifase gel e executa um movimento em arco em um plano perpendicular à superfície da célula ciliada e uma fase de batimento dito de recuperação, na qual o cílio se dobra em direção à superfície celular, retornando à posição inicial do ciclo através da fase de menor impedância, a hipofase sol, com uma velocidade cerca de duas vezes menor do que a do batimento efetivo (Figuras 4 e 5) .

Figura 4 - Visão lateral do batimento ciliar em suas fases de batimento efetivo para direita e de recuperação para esquerda (Modificado de Lorenzi, 1992).

A influência da motilidade ciliar sobre o meio fluido é maior na fase de batimento efetivo do que na fase de recuperação. Este fato, associado às diferentes viscosidades das fases do fluido brônquico, é responsável pela propulsão unidirecional do muco em direção às vias aéreas superiores. Assim sendo, as camadas mais superiores do fluido brônquico, preferencialmente representadas pela epifase gel, são propelidas predominantemente em uma direção, uma vez que estão mais distantes da ação retardatória da parede brônquica e recebem uma força maior por parte do cílio. Por outro lado, a hipofase sol está sob influência mais importante do

batimento de recuperação e forças inerciais da parede. Nessas condições é esperado que ocorra um fluxo oscilatório nesta região.

3.3 Transporte iônico do epitélio respiratório

O transporte mucociliar envolve três funções genéricas: geração de força, função secretora e transporte de água e íons, sendo que qualquer falha nessas funções é suficiente para comprometimento desse transporte.

As células epiteliais são polarizadas anatômica e funcionalmente, o que é fundamental para que exerçam suas funções.

Anatomicamente há um lado apical, composto pelo cílio e microvilos e o lado da membrana basolateral que volta-se para o espaço intersticial. Esses dois compartimentos são separados por junções conhecidas como *tight junctions*. Para fazer adequadamente seu papel funcional, o epitélio mucociliar controla o fluxo de água e íons através da secreção de Cl^- e da absorção de Na^+ (Boucher, 1994).

Entre o interior de uma célula e o fluido extracelular que a cerca existe, em regra, uma diferença de potencial transepitelial (PD). Os valores da PD representam a força potencial motriz que existe para manter um fluxo iônico ativo através do epitélio, e é dependente da magnitude e direção da rede de íons que atravessam a membrana da célula.

Mudanças na diferença de potencial transepitelial são indicativas, tanto da permeabilidade transepitelial, como do estado funcional dos canais iônicos que atravessam a membrana epitelial.

A descrição clássica de transporte iônico (Koefoed-Johnsen e Ussing, 1958) é um modelo básico amplamente aceito. Constitui-se na entrada passiva de sódio, a favor de gradiente eletroquímico, através da membrana basolateral.

Sabe-se que, em termos de concentrações, o sódio é o principal cátion extracelular, o potássio é o principal cátion intracelular e o cloreto o principal ânion intracelular. Segundo o modelo de Welsh (1987) a bomba de sódio, ao colocar este íon para fora da célula, através de um mecanismo de transporte ativo, contra o gradiente eletroquímico, cria condições favoráveis à secreção transepitelial de cloreto. Esta bomba mantém baixa a concentração intracelular de sódio, o que permite a entrada passiva, a favor do gradiente eletroquímico, deste mesmo íon. A entrada passiva do íon sódio para o meio intracelular se faz através de um mecanismo de co-transporte neutro, que acopla $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$. Assim, a entrada passiva de sódio fornece energia para a entrada de cloro. O cloreto penetra na célula contra gradiente eletroquímico e atinge concentrações superiores ao seu ponto de equilíbrio (Liedtke, 1989). Esta entrada de cloreto é eletricamente neutra e a natureza deste co-transporte ainda não está bem estabelecida. Há evidências de que a entrada de cloreto pela membrana basolateral seja controlada pelo AMPc e também pelo ATP (Davis, 1991; Knowles, 1981; Wong e Yates, 1988). O aumento do AMPc promove aumento na secreção transepitelial de cloreto, que pode ser então estimulada pelos neurotransmissores, como os beta-agonistas, e alguns mediadores da

resposta inflamatória, como a bradicinina, leucotrienos C₄ e D₄, adenosina, substância P e polipeptídeo vasoativo intestinal (Welsh, 1987).

Os canais de sódio, presentes na membrana apical, são os responsáveis pela absorção passiva deste íon, a favor de seu gradiente eletroquímico. Ainda na membrana apical, há os canais de cloreto, através dos quais este íon sai passivamente, pois, conforme o exposto, ele encontra-se em concentrações intracelulares acima de seu equilíbrio. O potássio também sai passivamente da célula, através de canais específicos presentes na membrana basolateral. Estes canais são muito importantes na manutenção da secreção transepitelial de cloreto. Quando esta é estimulada, ocorre um acúmulo intracelular de potássio, pois este entra na célula tanto através da bomba de sódio como através do cotransporte neutro já descritos. Graças à saída passiva de potássio por esses canais, não ocorre acúmulo intracelular excessivo deste íon, protegendo a célula de alterações volumétricas que lhe poderiam ser letais (Welsh, 1987; Liedtke, 1989; Anderson e cols, 1992).

Figura 5 - Mecanismos de absorção (A) e secreção (B) de íons, água e eletrólitos do epitélio respiratório. (TJ: tight-junction) (Modificado de LORENZI, 1994)

Em síntese, há um fluxo secretório de cloro do interstício para a luz das vias aéreas e um fluxo absorptivo de sódio no sentido oposto. O potássio tem um papel equilibrador. Estes mecanismos de transporte de eletrólitos são os responsáveis pela direção do movimento de fluídos, mais especificamente da água, através do epitélio. Estes fluxos de água e eletrólitos geram um gradiente eletroquímico, estabelecendo uma diferença de potencial transepitelial que varia, em condições normais, de 10 a 40 mV, convencionando-se o potencial na luz das vias aéreas como negativo (Boucher e cols, 1980; Welsh, 1987).

Assim, estão envolvidos na absorção e secreção de fluídos e eletrólitos através do epitélio das vias aéreas: canais seletivos de íons Na⁺,

K^+ , 2 Cl^- , a bomba NaKATPase (3Na2Kadenosinatrifosfatase) e a co-transportadora $NaK(Cl)_2$ (Welsh 1987, Winters e Yeates, 1997).

A absorção de líquidos é efetuada através de um canal específico na membrana apical que facilita a entrada de sódio, a favor de gradiente eletroquímico. Uma vez dentro da célula, o sódio saíra pela membrana basolateral, através da bomba Na-K-ATPase. A passagem do Na^+ provoca um desequilíbrio de cargas, gerando energia para a passagem ativa de Cl^- (Barroso, e cols, 1992)

A secreção de líquidos ocorre a partir de um mecanismo de co-transporte, que ao colocar na membrana basolateral Na^+ a favor de um gradiente eletroquímico, acopla a entrada de K^+ e Cl^- . O Na^+ e K^+ saem novamente pelo mesmo pólo, através da Na-K-ATPase e por canal específico para o K^+ , respectivamente. Por outro lado, o Cl^- sai pela membrana apical através de um canal específico de Cl^- (Barroso, e cols, 1992; Boucher, 1994).

A inflamação alérgica das vias aéreas pode afetar um desses processos ou diretamente ou através de mediadores secundários como as citocinas ou leucotrienos, muitos dos quais tem sido comprometidos na asma (Zund, 1996).

3.4 Acoplamento mucociliar

O controle da secreção da hipofase sol é de importância fundamental para o correto funcionamento do transporte mucociliar, de forma a manter os cílios em contato ideal com a epifase gel.

Portanto, fica claro que prejuízos do transporte ciliar podem ocorrer, se a distribuição destas duas fases, ou mesmo o volume das mesmas, for alterado. Um aumento no volume da hipofase sol propiciaria um desacoplamento entre o cílio e o muco da epifase gel, com conseqüente retardo do transporte ciliar. Uma diminuição da hipofase sol ou aumento da epifase gel fariam com que o batimento de recuperação ocorresse em um meio de maior viscosidade, reduzindo, conseqüentemente o transporte ciliar (Satir e Sleight, 1990).

A regulação da quantidade de fluido da hipofase sol depende das células epiteliais (em especial das células ciliadas), que possuem a capacidade tanto de secretar como de absorver líquido, utilizando a energia celular para movimentações iônicas contra um gradiente eletroquímico.

Os canais iônicos, além de regularem a quantidade de líquido na camada sol, provavelmente regulam o grau de hidratação do muco, modulando suas propriedades reológicas.

Assim, o transporte mucociliar é um dos mais importantes mecanismos de defesa do trato respiratório e a perfeita interação entre o muco e o epitélio ciliado resulta na capacidade de promover um fluxo de fluido em direção à orofaringe. Este fluxo sistemático e organizado, de um

meio com propriedades reológicas muito particulares, tem como consequência a depuração de substâncias e partículas depositadas ao longo do trato respiratório. A disfunção ou falência do transporte mucociliar pode interferir no sistema de proteção e vigilância do sistema respiratório. O aumento do tempo de contato com agentes agressores e a facilitação de colonização de bactérias predis põem o indivíduo a um maior risco de infecções respiratórias (Braga, 1990).

3.5 Asma

A asma, segundo o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH), é definida como: “doença inflamatória crônica de vias aéreas, na qual diversas células e seus elementos participam do processo, em particular, os mastócitos, os eosinófilos, os linfócitos T, os macrófagos, os neutrófilos e as células epiteliais. Em indivíduos suscetíveis, essa inflamação causa episódios recorrentes de chiado, dispnéia, aperto torácico e tosse. Esses episódios são associados com uma ampla, mas variada, obstrução ao fluxo de ar, geralmente reversível espontaneamente ou após tratamento. Essa obstrução, também está associada à existência de hiperresponsividade a uma variedade de estímulos” (NIH, 1998).

Adições importantes a esta definição incluem observações recentes de que a reversibilidade pode ser incompleta em alguns pacientes asmáticos e outros indivíduos com características de bronquite crônica podem

manifestar algum grau de reversibilidade a obstrução ao fluxo de ar (NIH 2003).

A inflamação constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma. É resultante de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas. Está presente em pacientes com asma de início recente, em pacientes com formas leves da doença e mesmo entre os assintomáticos. A resposta inflamatória tem características especiais que incluem infiltração eosinofílica, degranulação de mastócitos, lesão intersticial da parede das vias aéreas, e ativação de linfócitos Th2 que produzem citocinas como as interleucinas IL4, IL5 e IL13, entre outras, responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório. A IL4 tem papel importante no aumento tanto da produção de IgE específica como da expressão de receptores de alta e baixa afinidade à IgE por muitas células inflamatórias. Vários mediadores inflamatórios são liberados pelos mastócitos brônquicos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), pelos macrófagos (fator de necrose tumoral $TNF\alpha$, IL6, óxido nítrico), pelos linfócitos T (IL2, IL3, IL4, IL5 e fator de crescimento de colônia de granulócitos GM-CSF), pelos eosinófilos (MBP, ECP, EPO, mediadores lipídicos e citocinas), pelos neutrófilos (elastase) e pelas células epiteliais (endotelina 1, mediadores lipídicos, óxido nítrico). Através de seus mediadores as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico (substância P, neurocinina A) e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular,

hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (Fritsche, 2002).

Esses mediadores podem ainda atingir o epitélio ciliado causando-lhe dano e ruptura. Como consequência células epiteliais e miofibroblastos, presentes abaixo do epitélio proliferam e iniciam o depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal, o que explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes com asma. Outras alterações, incluindo hiperplasia e hipertrofia do músculo liso, elevação do número de células caliciformes, aumento das glândulas submucosas e alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, são constituintes do remodelamento que interfere na arquitetura da via aérea, levando a irreversibilidade da obstrução que se observa em alguns pacientes (Kumar, 2001).

A mortalidade da asma tem caído nos últimos anos nos Estados Unidos da América como foi relatado em um estudo publicado recentemente. Essa pesquisa mostra que houve aumento da mortalidade entre 1977 a 1994. Entretanto, houve redução em 2000 para 1,6 casos por 100.000, possivelmente por melhora do tratamento dessa doença (Sly, 2004).

Shafazand e Colice (2004) relatam que apesar da queda da mortalidade por asma, a prevalência que havia caído 6% entre 1997 e 1999, aumentou em 25% no ano de 2001, concluindo que apesar da queda da mortalidade, é prematuro dizer que a epidemia da asma chegou ao fim nos Estados Unidos.

Em um estudo realizado no Brasil entre 1993 e 1995, observou-se um aumento do diagnóstico de casos fatais da doença de 1 para 1,165 (Rio e cols, 2003). Em São Paulo, foram avaliadas as taxas trienais de mortalidade por asma em indivíduos de 5 a 34 anos de idade, no período de 1970 a 1995, observou-se aumento da mortalidade que foi de 0,2 óbitos/100.000 habitantes em 1971 a 0,6 no ano de 1994, devido ao aumento na capital. A maior frequência ocorreu no sexo feminino e nas faixas de 15 a 34 anos (Salto e cols, 1997).

Dados do Sistema de Informações do SUS mostraram que em Julho de 2005 o total de internações por asma no Brasil foi de 28.324, como mostra a Tabela abaixo.

Tabela 1 : Morbidade Hospitalar do SUS – por local de internação – Brasil
(Período: Julho/2005)
Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS)

TOTAL/Região	28.324
Região Norte	2.258
Região Nordeste	12.288
Região Sudeste	6.479
Região Sul	4.861
Região Centro-Oeste	2.438

A asma causa um grande impacto sócio-econômico. Durante os anos de 1993 a 1995 os gastos com o complexo asma e doença pulmonar obstrutiva crônica pelo SUS foram 60 milhões de reais, sendo de 200 reais o custo por dia por doente hospitalizado. Em 1996, o gasto foi de 76 milhões

de reais com as internações por asma, o correspondente a 2,8% anual da receita com a saúde. Isso representou o terceiro maior valor de gastos do SUS em todo país com uma doença. Os custos diretos com o tratamento da asma, representados pelos gastos do SUS, revelam o impacto econômico da doença. Os custos indiretos representados por absenteísmo escolar, perda de produtividade e morte precoce, associados ao sofrimento humano e aos impactos psicossociais dela decorrentes são incalculáveis e geralmente maiores que os custos diretos. Em nosso meio os custos indiretos da asma são desconhecidos.

3.6 Transporte mucociliar na asma

Durante a inflamação das vias aéreas como a que ocorre em infecções virais agudas, as mudanças no transporte mucociliar são pequenas e transitórias (Camner e cols 1973). Já em condições como na bronquite crônica, fibrose cística e asma, mudanças permanentes na estrutura e função ciliar, na hipersecreção de muco e/ou mudanças reológicas, resultam em prejuízo à proteção do sistema respiratório (Wanner e cols 1977).

Buys, 1984, mostrou que a peroxidase eosinofílica (EPO) tem uma estrutura semelhante à mieloperoxidase e na presença de H_2O_2 , cloreto, brometo ou iodeto apresenta atividade citotóxica contra vários organismos. E é capaz de inativar leucotrienos, é tóxica para o epitélio brônquico e pode também causar paralização ciliar (Motojima, 1989)

As evidências de repercussões funcionais sobre o aparelho mucociliar na asma, como a hipersecreção de muco e o dano e destruição das células ciliadas vieram de estudos histopatológicos de pulmões de pacientes que morreram durante estado asmático.

Huber e Koessler, em 1922, publicaram um artigo descrevendo 21 casos de pacientes que morreram de asma e descreveram um aumento de células caliciformes em 5 casos. A partir daí muitos artigos na literatura mencionaram mudanças no epitélio respiratório de pacientes asmáticos (Steinberg, 1928; Mac-Donald, 1932; Bupert e Warner, 1935; Michael e Rowe, 1935; Jorgensen, 1936; Lamson e Butt, 1937; Fowler, 1937; Craige, 1941).

Hilding em 1943 e Dunnill em 1969 encontraram uma redução no número de células ciliadas, metaplasia de células caliciformes e grande quantidade de muco hiperviscoso em pacientes que haviam morrido por asma. Os autores sugeriram que modificações ocorridas durante a crise de asma estavam associadas a uma marcada disfunção ciliar e diminuição do transporte mucociliar.

Para confirmar esta hipótese, Santa Cruz e cols, 1974, estudaram a velocidade do muco traqueal de pacientes idosos com doença pulmonar obstrutiva através de cinebroncoscopia e mostraram uma considerável diminuição no transporte mucociliar. Além disso, Foster e cols, 1976, encontraram uma redução considerável no transporte mucociliar na traquéia de pacientes asmáticos sintomáticos. No mesmo ano, Mossberg, estudou o transporte mucociliar de 12 pacientes asmáticos através da inalação de um

aerossol teste com 6µm de partículas de Teflon e ^{99m}Tc . A mensuração externa da radioatividade pulmonar nos pulmões foi realizada por duas horas, não mostrando diferenças significativas entre asmáticos e indivíduos não fumantes. Foster e cols, 1982, determinaram que o transporte mucociliar sofria mudanças apenas em vias aéreas altas. Este resultado contrastou com aqueles obtidos mais tarde por Bateman e cols, 1983, e confirmado por Daviskas e cols, 1995, que mostraram que mudanças no transporte mucociliar estão presentes em toda árvore brônquica.

Segundo Allegra e cols, 1989, em pacientes asmáticos a hipersecreção do muco causa uma diminuição da freqüência de batimento ciliar durante a inflamação brônquica e produz danos funcionais e estruturais ao aparelho mucociliar.

Pavia e cols, 1985, mostraram que pacientes asmáticos com remissão completa, livres de sintomas e sem uso de medicação tem transporte mucociliar diminuído em relação à não fumantes com características físicas e função pulmonar similares, questionando a remissão completa da doença. Messina e cols, 1991, demonstraram anormalidades graves, mas reversíveis, no transporte mucociliar de pacientes asmáticos requerendo hospitalização; o transporte mucociliar foi mensurado usando radioaerossol. Eles foram estudados no segundo e terceiro dia após admissão e após alta hospitalar. Quando hospitalizados 96% da radioatividade inicial estava retida após 2 horas, indicando prejuízo do transporte mucociliar. Após a alta o transporte foi notavelmente aumentado,

com apenas 71% retido em 2 horas, mostrando a piora do transporte durante a fase aguda da doença.

As discrepâncias entre os estudos são provavelmente devido as diferentes técnicas utilizadas e diferentes estágios clínicos da doença. Além disso, um dos maiores problemas no estudo do transporte mucociliar em humanos, é que não há uma técnica padronizada.

Assim, o epitélio é lesado de forma importante na asma, e as consequências funcionais que as alterações epiteliais poderiam acarretar são diversas. Além disso, considera-se o epitélio brônquico não só o alvo da inflamação crônica, mas como um participante ativo nos processos patogénéticos que levariam ao desenvolvimento e perpetuação da doença (Rennard, 1995).

3.7 Remodelamento das vias aéreas

O remodelamento das vias aéreas é um termo que descreve mudanças estruturais nas vias aéreas na asma. A patologia inclui mudanças ao longo da parede das vias aéreas, incluindo o epitélio (Fahy, 2000).

A descamação do epitélio das vias aéreas tem sido considerada uma característica patológica da asma devido a observações de descamação epitelial em espécies pós-morte (Houston, 1953 e Dunnill, 1960) e em biópsias endobrônquicas de pacientes com asma (Laitinen, 1985 e Jeffery, 1989).

Os achados de acúmulos de células no muco em asmáticos (corpos de Creola) (Naylor, 1962) e aumento no número de células epiteliais no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com asma (Wardlaw, 1988, Beasley, 1989 e Chanez, 1999) tem reforçado a idéia de que a descamação epitelial é uma característica patológica da asma. A hiperreatividade de vias aéreas na asma pode estar relacionada à descamação epitelial através de mecanismos que envolvem a perda do fator relaxante derivado do epitélio (Aizawa, 1988 e Vanhoutte, 1988). Esta hipótese ganhou suporte indireto de estudos clínicos em indivíduos asmáticos, em que foi observada uma significativa correlação inversa entre número de células epiteliais no LBA e intensidade da hiperreatividade das vias aéreas (Jeffery, 1989, Wardlaw, 1988 e Beasley, 1989).

A eosinofilia das vias aéreas é uma característica da asma, e tem sido especulado que a descamação de células epiteliais pode ser devida à ação dos grânulos protéicos eosinofílicos (Laitinem, 1985, Jeffery, 1989 e Gleich, 1988).

No entanto, a descamação epitelial não tem sido relatada em modelos murinos de inflamação alérgica, apesar da intensa eosinofilia da mucosa das vias aéreas (Blyth, 1996 e Trifilieff, 2000).

As células caliciformes e glândulas da submucosa são as fontes de glicoproteínas mucinas (mucinas) nas vias aéreas. Mucinas são os mais importantes constituintes do muco respiratório e os mais importantes determinantes de suas propriedades viscoelásticas e de adesividade (Rose, 1997 e Fahy, 1998). Essas glicoproteínas são importantes para a defesa

respiratória, mas representam uma importante causa da obstrução das vias aéreas quando secretadas em excesso. A asma fatal, por exemplo, está quase sempre associada à oclusão das vias aéreas por plugues de muco (Houston, 1953 e Dunnill, 1960, Huber, 1922 e Carroll 1993).

Além disso, a produção de escarro é um sintoma comum na asma, especialmente durante exacerbações (Oppenshaw, 1989), e uma história de produção de muco está independentemente associada a uma acelerada queda no VEF₁ (Lange, 1998).

Os mecanismos responsáveis pela hipersecreção de muco na asma são pouco compreendidos. Porque o muco é principalmente uma mistura de mucinas e proteínas plasmáticas, é possível que alterações nas células caliciformes, glândulas submucosas e células endoteliais vasculares possam independentemente ou juntas, resultar em excesso de muco nas vias aéreas. O número de vasos sanguíneos está aumentado na submucosa na asma (Li, 1997), e muitos mediadores inflamatórios associados com a asma, incluindo histamina e leucotrienos (Persson, 1986 e Chung, 1990), são conhecidos por promover aumento de permeabilidade vascular. Portanto, o vazamento excessivo de plasma dos vasos sanguíneos na submucosa pode contribuir para hipersecreção aguda e crônica na asma. Previamente, foram encontradas concentrações aumentadas de mucinas no escarro induzido de pacientes com asma, o que sugere uma anormalidade na secreção celular das células caliciformes e glândulas submucosas na asma.

A contribuição relativa das células caliciformes e glândulas submucosas para o componente mucina do muco das vias aéreas na asma

é incerta. O aumento das glândulas submucosas não é comumente mencionado em biopsias brônquicas de estudos de asma leve e moderada, mas o aumento no volume das glândulas é descrito em casos de asma fatal (Carroll, 1993). A hiperplasia de células caliciformes é descrita em casos de asma fatal (Dunnill, 1960, Aikawa, 1992 e Shimura, 1996), mas ainda existem dúvidas se a hiperplasia de células caliciformes é uma característica da asma leve e moderada. Um estudo de biopsias brônquicas de pessoas com asma leve não encontrou aumento de células caliciformes no epitélio das vias aéreas (Lozewicz, 1990), mas este estudo pode ter subestimado o número de células caliciformes devido à coloração do epitélio com hematoxilina e eosina e uma contagem de células caliciformes utilizando metodologia semiquantitativa.

Para melhor explorar anormalidades na função das células caliciformes na asma leve e moderada, foi analisado o tamanho e número de células caliciformes em indivíduos com asma leve e moderada e examinada a relação entre as mucinas armazenadas e secretadas nas vias aéreas (Ordoñez, 2001) aplicando o método da estereologia. Pela aplicação deste método em biopsias brônquicas de indivíduos saudáveis e pacientes com asma, encontrou-se um número de células caliciformes maior no epitélio de asmáticos que no de indivíduos saudáveis (Ordoñez, 2001). Isto resultou em um volume de mucinas armazenadas no epitélio de aproximadamente três vezes mais quando comparado ao normal. Surpreendentemente, encontrou-se uma relação inversa entre as mucinas armazenadas no epitélio e as mucinas secretadas no escarro induzido. Esses achados podem ter ao

menos duas implicações fisiopatológicas: primeiro, mesmo a asma leve estava associada ao aumento de mucinas armazenadas, hipersecreção de mucinas resultantes de uma degranulação de células caliciformes aguda e esse pode ser um mecanismo importante de exacerbação da asma nesses pacientes; segundo, o achado de que as mucinas armazenadas na asma moderada eram semelhantes às da asma leve levanta a possibilidade de que a asma moderada esteja associada ao início da degranulação de células caliciformes o que poderia contribuir para a fisiopatologia da obstrução crônica de vias aéreas nesses pacientes. Essa possibilidade se confirma com níveis maiores de mucina no escarro induzido de asma moderada quando comparado à asma leve.

A descamação epitelial nos casos de asma nem sempre está associada à doença, podendo ser consequência da coleta e manuseio do tecido. Por outro lado, a hiperplasia de células caliciformes está bem estabelecida como uma característica patológica da asma leve, moderada e grave. Alterações do número de células caliciformes são acompanhadas de mudanças nas mucinas armazenadas e secretadas. A consequência funcional dessas mudanças nas mucinas armazenadas e secretadas pode ser uma contribuição aos mecanismos fisiopatológicos de várias anormalidades clínicas, incluindo produção de escarro, estreitamento de vias aéreas e exacerbação da asma. Os mecanismos de hiperplasia e degranulação de células caliciformes na asma ainda são pouco compreendidos, mas merecem maiores investigações devido à sua

importância na hipersecreção de mucinas e como causa de morbidade e mortalidade na asma.

3.8 Modelos experimentais de asma

Muitos modelos experimentais de asma foram produzidos pela inalação ou injeção de antígenos apropriados (Booth , 1970; Khai e cols 2001; Kips e cols 2003).

Alguns modelos tentam reproduzir a asma humana em camundongos, através de um estágio de sensibilização, geralmente por injeção intraperitoneal de ovoalbumina, uma proteína extraída da clara do ovo, associada a um adjuvante. O adjuvante mais utilizado para os modelos murinos é o hidróxido de alumínio, conhecido como Alumen, e inalações sucessivas de ovoalbumina (Kasahara e cols).

No entanto, poucos foram os trabalhos realizados para o estudo do aparelho mucociliar em modelos experimentais de asma. Wanner e cols, 1975, utilizaram extrato de *Ascaris suum* para sensibilizar cães e observaram a velocidade de transporte mucociliar (VTM) *in vivo* através de um broncofibroscópio que gravou o transporte das partículas de teflon pelos cílios da traquéia. Os cães expostos ao aerossol mostraram diminuição na VTM de 1/3 do valor basal em 45 minutos, ao passo que apenas metade respondeu com broncoespasmo, como mensurada por uma redução significativa na condutância do sistema respiratório. Os animais ainda entubados, receberam aerossol de acetilcolina e histamina, os quais

aumentaram a VTM, excluindo estes mediadores como responsáveis por um prejuízo na VTM na asma.

Em 1986, Wanner e cols utilizaram o mesmo extrato para estudar a atividade ciliar em vias aéreas de ovelhas, as quais dividiram em alérgicas e não alérgicas. A proposta do trabalho foi determinar se atividade ciliar na via aérea, componente do transporte mucociliar, exibe resposta exacerbada à prostaglandina E₁ (PGE₁), prostaglandina E₂ (PGE₂) e leucotrieno D₄ (LTD₄), em ovelhas alérgicas quando comparado a não alérgicas, e se os efeitos do LTD₄ são diretos ou envolvem a geração de produtos da ciclooxygenase do metabolismo do ácido aracdônico. A frequência de batimento ciliar (FBC) foi mensurada *in vitro*, em células epiteliais traqueais obtidas das ovelhas. O trabalho mostrou que, a FBC basal não foi diferente entre os grupos; PGE₁, PGE₂ e LTD₄, tendo sido induzido um aumento dose-dependente na FBC, e esses aumentos não foram diferentes entre as ovelhas alérgicas e não alérgicas; e que LTD₄ aumenta a FBC indiretamente via ativação da ciclooxygenase.

Além de poucos, os trabalhos não estudam de forma sistemática a FBC, componente do transporte mucociliar, em modelos de asma *in vivo* e/ou frente à inalação de medicamentos utilizados em sua terapêutica.

3.9 Medicamentos utilizados no tratamento da asma

Os medicamentos que são utilizados para o tratamento da asma podem interferir tanto na composição do muco como na frequência de batimento ciliar, podendo ter efeito significativo sobre o transporte mucociliar. Entretanto, os trabalhos em que o efeito desses medicamentos foi investigado de forma sistemática em modelos experimentais de asma e/ou *in vivo* são em número reduzido.

Dentre os tratamentos utilizados para a asma, o uso de fármacos de ação broncodilatadora, sobretudo os agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos é um dos pilares do tratamento, sendo útil para a reversão dos sintomas de dispnéia e de aperto torácico. No Brasil, temos à disposição dos pacientes os seguintes compostos: salbutamol, fenoterol, terbutalina, bambuterol, salmeterol e formoterol.

Fármacos beta adrenérgicos

Os agonistas broncodilatadores β_2 -adrenérgicos tem a sua ação sobre os receptores adrenérgicos do tipo 2 na superfície da membrana celular de fibras musculares lisas da parede de vias aéreas, mastócitos, linfócitos T e nas células do epitélio respiratório.

No entanto, várias questões a respeito do efeito de substâncias simpatomiméticas e parassimpatomiméticas na atividade mucociliar de asmáticos ainda permanecem sem solução.

AS, 1974, estudou o papel do β_2 estimulante salbutamol em concentrações sucessivas de 10^{-8} a 10^{-4} M em uma preparação de via aéreas de quatro ratos Wistar, da traquéia até vias menores *in vitro*. A curva dose-resposta obtida sugeriu que os simpatomiméticos exercem seus efeitos no sistema adenil ciclase - AMP cíclico, que é dependente da estimulação de β -receptores.

Mossberg e cols, 1976, estudaram o transporte mucociliar de 12 pacientes asmáticos e os autores não mostraram diferenças significativas entre estes e indivíduos não fumantes. O transporte foi determinado também após administração subcutânea de terbutalina e veículo, em estudo duplo-cego. A terbutalina melhorou o transporte mucociliar em asmáticos, embora consideravelmente menos que nos sujeitos saudáveis.

Verdugo e cols, 1980, investigaram o efeito do isoproterenol *in vitro* na atividade ciliar de células epiteliais de traquéia de coelhos, e notaram um aumento da atividade mucociliar e que este efeito é β adrenérgico específico, visto que essa estimulação pode ser bloqueada pelo propanolol.

Hybbinette e Mercke, 1982, investigaram o efeito da metacolina (0,01-2 μ g/kg) em seio maxilar de coelhos *in vivo*, mostrando um aumento dose-dependente na atividade mucociliar. Em contraste, a atropina na dose de 0,05-0,5 mg/kg não influenciou a atividade mucociliar, e na dose de 0,2 mg/kg reduziu ou inibiu o efeito da metacolina. Posteriormente, Hybbinette e Mercke, 1982, utilizando o mesmo modelo experimental, estudaram o efeito de agonistas e antagonistas simpatomiméticos. O β agonista isoprenalina e o β_2 agonista salbutamol induziram uma aceleração dose dependente na

freqüência de batimento ciliar (FBC). No entanto, o β_1 agonista prenalterol não influenciou a FBC basal. O agonista seletivo α_1 fenilefrina e o agonista seletivo α_2 oximetazolina induziram redução dose dependente na FBC. O antagonista não seletivo β propanolol e o antagonista não seletivo α fentolamina não influenciaram a FBC basal. O propanolol reduziu o efeito da isoprenalina e salbutamol, e a fentolamina reduziu o efeito da oximetazolina. Os autores concluíram que durante condições basais a FBC de coelhos *in vitro*, independe da atividade simpática e que os agonistas simpatomiméticos agem tanto nos β_2 adrenoreceptores acelerando a FBC quanto nos α_1 e α_2 adrenoreceptores com um efeito retardatório, todos de maneira dose-dependente. Wong e cols, 1988, estudaram o efeito do broncodilatador β_2 adrenérgico fenoterol e do broncoconstritor metacolina na FBC *in vivo* de 4 e 8 cães, respectivamente. O fenoterol aerossolizado a 10^{-5} M estimulou a FBC e a metacolina estimulou a FBC de 5,8 a 9,4 Hz na concentração de 10^{-8} M e a 12,6 na concentração de 10^{-6} M.

Devalia e cols, 1992, estudaram o *transporte* mucociliar *in vitro* em cultura de células epiteliais brônquicas de pacientes que se submeteram à cirurgia pulmonar após exposição aos β_2 adrenérgicos salbutamol e salmeterol. O salbutamol na concentração de 10^{-4} M causou um aumento transitório, mas significativo na FBC, após 2 horas de incubação. Em contraste, o salmeterol foi maximamente ativo na concentração 10^{-6} M, causando um rápido e prolongado efeito na FBC após 15 min e 24 h de incubação. O propanolol (10^{-6} M) anulou o efeito do salbutamol, mas não o salmeterol em induzir aumento na FBC.

Fármacos anticolinérgicos

A atropina e o brometo de ipratrópio são antagonistas colinérgicos com efeito broncodilatador em várias situações clínicas. Muitos investigadores concordam que a atropina deprime o transporte mucociliar e inibe a atividade ciliar nas vias aéreas quando administrada de várias formas, inclusive inalatória (Blari e cols, 1969; Bulbring e cols, 1953; Burton e cols, 1962; Foster e cols, 1976; Inness e cols, 1970; Pavia e cols, 1971; Sackner e cols, 1977; Berger e cols, 1978; Chopra e cols, 1978). A diminuição do transporte mucociliar pela atropina pode promover colonização, e possíveis infecções, como constatado por Whiteside e cols 1984. Devido a essas ações adversas da atropina, existe grande interesse nos efeitos do brometo de ipratrópio na função mucosa. Em contraste à atropina, o ipratrópio, na concentração de 10^{-3} g/ml, mostrou deprimir minimamente a frequência de batimento ciliar, menos que 20% em via aérea de ratos (Iravani, 1972). Em cães anestesiados, a velocidade do muco traqueal diminuiu menos que 20% após inalação de 40 μ g de ipratrópio, em contraste a 60% após inalação de 750 μ g de atropina (Sackner e cols, 1977). No entanto, vários estudos têm mostrado que uma simples administração de brometo de ipratrópio (dose de 160 μ g) ou administrações em longo prazo (dose de 200 μ g por dia) falharam em deprimir o *transporte* mucociliar em indivíduos normais e em pacientes com asma ou bronquite crônica (Borum, 1979; Pavia e cols, 1979; Pavia e cols, 1980; Ruffin e cols,

1978; Konietzko e cols, 1974; Francis e cols, 1977). No entanto, nenhuma explicação convincente foi ainda proposta para a diferença entre ipratrópio e atropina inalada, a respeito da função mucociliar.

3.10 Modelos experimentais para o estudo do transporte mucociliar

Diversos estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver formas de avaliar o *transporte* mucociliar através de modelos experimentais. Existe uma variedade de modelos que permitem estudar a interação muco-cílio ou mesmo o comportamento isolado de cada um deles, como a observação *in vitro* do transporte mucociliar realizado em palato de rã ou em vias aéreas de animais *in situ*, o viscosímetro tipo duplo capilar, o viscosímetro *cone and plate* e o microreômetro magnético que possibilitam o estudo do muco (Wills e cols 1995, Wills e cols 1997), a diferença de potencial transepitelial, que permite o estudo de alterações na permeabilidade transepitelial, e alguns métodos que captam a frequência de batimento ciliar através de técnica de emissão de sinais fotoelétricos.

As técnicas fotoelétricas que são correntemente utilizadas nos estudos de atividade ciliar são baseadas na emissão de luzes que se refletem no epitélio ciliar ativo. Os sinais fotoelétricos obtidos são produzidos pelo batimento do cílio e são uma somatório da atividade ciliar na área observada. Esta idéia de reconstrução do batimento ciliar pelos sinais fotoelétricos foi previamente estudada teoricamente (Rabinovit e cols, 1990) e experimentalmente (Sadé e cols, 1970; King e cols, 1974; Braga e cols,

1988; Lansley e cols, 1992). Esses experimentos são realizados em sua maioria *in vitro* em células epiteliais ciliadas ou sobre o epitélio ciliado de palato de rã.

O palato de rã foi talvez a mais óbvia escolha devido à sua disponibilidade e similaridade com sistemas superiores para o estudo *in vitro* do *transporte* mucociliar. O palato de rã tem um epitélio pseudoestratificado composto de células ciliadas, células secretoras de muco e coberto com duas camadas de filme periciliar.

A primeira descrição da capacidade do cílio do palato de rã de carregar peso foi publicada por Stewart, em 1948. Em 1970, Sadé e cols descreveram a importância da interação entre o muco e o cílio na facilitação do *transporte* de partículas. Esses e outros trabalhos proporcionaram a base para o uso do palato de rã como um modelo prático para se estudar o *transporte* mucociliar (Sadé e cols, 1975; King e cols, 1998; Negri e cols, 1987). Em nosso laboratório, este método vem sendo bastante utilizado desde 1987, para o estudo do *transporte* mucociliar (Festa e cols, 1985a; Festa e cols, 1985b; Festa e cols, 1987; Lorenzi e cols, 1992; Festa e cols, 1996a; Festa e cols, 1996b; Macchione e cols 1998). No entanto, o desenvolvimento de um modelo experimental *in vivo* para investigação do *transporte* mucociliar capaz de permitir mensurações em um animal pequeno após indução de doença pulmonar e/ou frente à inalação de drogas, vem se mostrando cada vez mais necessário.

Este estudo, portanto, se propõe a desenvolver um modelo experimental *in vivo* que possibilite estudar o *transporte* mucociliar mediante

a mensuração da frequência de batimento ciliar e diferença de potencial transepitelial em traquéia de camundongos controle e camundongos com inflamação crônica de vias aéreas e, além disso, observar possíveis mudanças nesses mecanismos após a inalação de drogas utilizadas para o tratamento da asma.

MÉTODOS

4 MÉTODOS

O protocolo experimental 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 *Swiss*, machos, adultos, com idade entre 10 e 14 meses e peso variando entre 50 e 55 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério conjunto de manutenção dos Laboratórios de Investigação Médica - LIM 5 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 segundo as drogas utilizadas após a fase de sensibilização.

4.1 Protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar

Para produzir o modelo de inflamação pulmonar, um antígeno foi injetado via parenteral para induzir uma sensibilização sistêmica e o mesmo antígeno foi administrado pelas vias aéreas, o foco do processo inflamatório, por aerossol.

Os camundongos mais utilizados nesses estudos são o BALB/c e C57BL/6 por apresentarem maior responsividade de vias aéreas.

No entanto, após estudo piloto utilizando as linhagens de camundongos BALB-c e Swiss, optamos por este último por apresentar maior tamanho (até 50 g) o que possibilitou melhor visualização da traquéia durante o estudo do transporte mucociliar. Além disso, durante o estudo piloto utilizando o protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina, modificada de Kasahara e cols, 2005, nos certificamos da resposta inflamatória nesses animais.

O protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina teve a duração de 31 dias. Os camundongos 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 ou 29 os animais foram colocados em uma caixa de exposição de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (US – 1000, ICEL, São Paulo, Brasil) e submetidos à inalação de um aerossol de ovoalbumina (OVA) diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) na concentração de 10 mg/ml (1%). O tempo em que os animais estavam em contato com o aerossol foi cronometrado e constou de 30 minutos (Figura 4). Ao mesmo tempo, o Grupo Controle 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 (Figura 5).

Os estudos foram realizados quarenta e oito horas (48 horas) após o último desafio antigênico, ou seja, nos dias 30 para os animais que receberam a última sensibilização no dia 28, e nos dia 31 para os que foram sensibilizados dia 29. Tal tempo foi escolhido por apresentar maior resposta inflamatória, como observado na literatura (Tomkinson e cols, 2001) e comparado com experimentos pilotos.

Figura 6 - Esquema do Protocolo de sensibilização com Ovalbumina

Figura 7 - Esquema do Protocolo dos animais controle

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram subdivididos em grupos:

animais *NAIVE*, que não foram submetidos a nenhum protocolo ou tratamento;

animais *CONTROLE*, que participaram do protocolo de inflamação pulmonar, mas que receberam salina/adjuvante intraperitoneal (ip) e solução salina 0,9% inalatória (*CONTROLE*)

animais *OVA*, sensibilizados por ovoalbumina, para indução de inflamação de vias aéreas, que participaram do protocolo de inflamação pulmonar e receberam ovoalbumina e adjuvante ip e ovoalbumina 10 mg/ml inalatória (*OVA*), segundo protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar.

Após o estabelecimento dos grupos, iniciamos a procura por um anestésico que fosse capaz de manter o animal em respiração espontânea por aproximadamente 30 minutos, e que não causasse depressão no aparelho mucociliar. Realizamos estudos com a utilização de Hypnol 3% (pentobarbital sódico) 70 mg/kg, por via intraperitoneal; tiopental sódico, 50 mg/kg por via ip; cetamina (Ketalar), 25 mg/kg e xilazina (Rompum), 5 mg/kg por via ip; e cetamina e xilazina nas doses de 50 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, que foram escolhidas por permitirem que o animal permanecesse em respiração espontânea por até 60 minutos.

4.3 Mensuração da frequência de batimento ciliar *in vivo*

Para os experimentos, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamin, Cristália S.A., solução injetável 50 mg/ml) 50 mg/kg de peso e cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer S.A., solução aquosa 2%) 40 mg/kg de peso por via intramuscular. Metade da dose inicial dos dois anestésicos foi administrada imediatamente sempre que necessário.

Após a anestesia o animal foi posicionado sobre uma superfície rígida, em leve extensão cervical e foi realizada a exposição do epitélio traqueal através de procedimento cirúrgico (retirada de cerca de 3 mm da parede anterior da traquéia).

Imediatamente após a abertura desta janela na traquéia o animal foi posicionado sob um microscópio ótico (Olympus BX 50) acoplado a uma filmadora (Sony 3 CCD Iris), para visualização e captação da imagem do epitélio ciliar traqueal que foi enviada a um monitor (Sony Trinitron). A medida da FBC foi realizada em uma sala escura onde a fonte de luz era gerada através de um estroboscópio focal (Machine Vision Strobe 5000), colocado a uma distância aproximada de 2 cm do epitélio traqueal e que emite feixes luminosos a uma frequência conhecida (Figura 8). Após a localização do campo a ser mensurado, através da observação do epitélio ciliar pela imagem gerada no monitor (Figura 9), a determinação da FBC foi realizada de três a cinco vezes para a obtenção de um valor médio.

Figura 8 - Equipamento para mensuração da Frequência de batimento ciliar

Figura 9 - Imagem do epitélio respiratório traqueal de camundongo gerada pelo monitor

Para nos certificarmos do estabelecimento do modelo de mensuração da frequência de batimento ciliar, componente do transporte mucociliar, em camundongos *in vivo* e demonstrarmos a responsividade do modelo, realizamos inicialmente a inalação de capsaicina em animais *NAÏVE*, uma substância de ação cilioexcitatória conhecida. Estes animais foram divididos em grupos que inalaram solução salina 0,9% por 15 minutos ($n = 6$), acetilcolina 10^{-3} M por 15 minutos (ACh) ($n = 4$) e capsaicina $3 \cdot 10^{-9}$ M por 5 minutos (CAPS) ($n = 7$). A frequência de batimento ciliar foi mensurada imediatamente após a abertura e exposição da traquéia (valor BASAL) e após a inalação das substâncias.

Estudamos também, animais controle (CONTROLE) e animais sensibilizados por ovoalbumina (OVA), divididos em grupos que inalaram solução salina 0,9% por 5 minutos ($n = 7$ e 5 , respectivamente), salbutamol $3,5 \cdot 10^{-4}$ M por 5 minutos ($n = 6$ e 6 , respectivamente), salbutamol $3,5 \cdot 10^{-3}$ M por 5 minutos ($n = 7$ e 7 , respectivamente), brometo de ipratrópio 10^{-4} M ($n = 10$ e 6 , respectivamente) e brometo de ipratrópio $6 \cdot 10^{-4}$ M ($n = 5$ e 5 , respectivamente). A frequência de batimento ciliar foi medida imediatamente após a abertura da traquéia (valor BASAL) e após a inalação da droga.

As inalações das drogas foram realizadas em uma caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico Devilbiss – Ultraneb 99 (Sunrise Medicals, USA). As partículas geradas foram menores que 10 μ m de diâmetro. Após os procedimentos os animais, ainda sob efeito anestésico, foram sacrificados por dissecação da aorta abdominal.

4.4 Mensuração da diferença de potencial transepitelial

Em relação às propriedades bioelétricas do epitélio respiratório, as medidas da diferença de potencial transepitelial são utilizadas para estudar a integridade da membrana epitelial e as ligações entre as células do epitélio, como por exemplo, as junções intercelulares do epitélio respiratório, além de mostrar a capacidade do epitélio na regulação dos fluídos (Knowles e cols, 1981; Welsh, 1987).

Para os experimentos, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamin, Cristália S.A., solução injetável 50 mg/ml) 50 mg/kg de peso e cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer S.A., solução aquosa 2%) 40 mg/kg de peso por via intramuscular. Logo após a anestesia foi realizada a exposição do epitélio traqueal através de uma janela na parede anterior da traquéia.

A mensuração da diferença de potencial transepitelial (PD) foi realizada logo após a exposição da traquéia (valor BASAL) em animais controle (CONTROLE) e em animais sensibilizados por ovoalbumina (OVA) (n = 16 e 14, respectivamente).

A diferença de potencial transepitelial (PD) foi realizada segundo a técnica modificada e validada por Lacaz-Vieira & Procópio, 1988. Foram utilizados dois microeletrodos flexíveis (pontes de Agar), saturados com KCl, conectados a duas semi-células de calomelano, sendo uma de referência e outra de teste, ambas ligadas a um eletrômetro aterrado de grande alimentação (Figura 10). Para a medida da PD, após a calibração, o eletrodo

de referência foi colocado na submucosa do animal, e o eletrodo teste, na superfície epitelial da traquéia dos camundongos.

Figura 10 - Equipamento para mensuração da Diferença de Potencial transepitelial

Para que fosse possível adaptar o microeletrodo teste à superfície epitelial, sem que houvesse interferências, uma vez que o microeletrodo utilizado ultrapassava a extensão da traquéia, utilizamos um cateter epidural de nylon (Abbott, Laboratories).

Para validarmos a mensuração da PD traqueal, durante o protocolo mensuramos a PD no palato e língua do animal, que sabidamente é bastante negativa (entre -26 mV e -16 mV).

Após os procedimentos os animais, ainda sob efeito anestésico, foram sacrificados por dissecação da aorta abdominal.

4.5 Lavado broncoalveolar

Após as mensurações finais os animais foram então traqueostomizados para a realização do lavado broncoalveolar (LBA). Através de uma cânula traqueal foi infundida, com o uso de uma seringa, 0,5 ml de solução salina por 3 vezes consecutivas, totalizando um volume de 1,5 ml. O volume recuperado foi centrifugado a 800 rpm, a 5°C, por 8 minutos. O botão celular foi ressuspenso em 1000 µl de solução salina e 0,1% de BSA. A contagem total de células foi realizada por microscopia ótica com o hemocítmetro de Neubauer em aumento de 400x.

Para a contagem diferencial, 200 µl do LBA foram citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos e após seca a lâmina foi corada pelo corante de Giemsa.

A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de pelo menos 200 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos com o auxílio de um microscópio ótico com objetiva de imersão (1000X).

4.6 Análise histológica da cavidade nasal, traquéia e pulmão

Após a realização do LBA , a cabeça do animal foi removida e na cavidade nasal foi instilado 5 ml de formalina 10%. O excesso de tecido e a região inferior da mandíbula foram removidos, a cabeça foi imersa em formalina por 1 dia, e então submetida à descalcificação em 5% de EDTA por 14 dias.

Secções de 5 µm foram realizadas no nível I, ou nível proximal, da cavidade nasal na região posterior dos dentes incisivos superiores. Isso permite a avaliação das células epiteliais da cavidade nasal e a interpretação de mudanças no epitélio após uma agressão (Herbert & Leininger, 1999).

A traquéia e os pulmões também foram coletados, os pulmões foram insuflados (0,3 ml) através da cânula traqueal, com paraformoldeído 4%, e imersos na mesma solução durante 24 horas à temperatura ambiente para análise histológica por microscopia óptica. 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. A espessura dos cortes foi de 5 µm e utilizou-se a coloração Hematoxilina-Eosina para morfologia geral, e uma combinação de Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Azul Alciano (AB) em pH = 2,5 para detecção de mucinas ácidas e neutras e identificação de células com muco armazenado. A seqüência PAS-AB cora as substâncias ácidas do muco em azul e as neutras em vermelho. Os

polissacarídeos ácidos corados em azul ou púrpura no pH = 2,5 incluem o ácido hialurônico, sialomucinas e quase todas as muco-substâncias sulfatadas mais fortemente ácidas; os mucopolissacarídeos corados em vermelho com o AB em pH 2,5 e PAS incluem muco-substâncias neutras e algumas acidófilas mascaradas (Jones e cols 1973)

Quantificação das células epiteliais e mucosubstâncias intraepiteliais

A região do epitélio respiratório nasal analisada seguiu o septo nasal. As células e mucosubstâncias do epitélio respiratório da cavidade nasal, traquéia e vias aéreas distais foram quantificadas utilizando-se morfometria convencional.

A quantificação de mucosubstâncias neutras e ácidas foi acompanhada com um microscópio óptico provido de uma objetiva contendo 50 retas de 1 mm, com um ponto em cada extremidade e uma área conhecida de $10.000 \mu\text{m}^2$ em um aumento de 1000x. Neste aumento, a fração de volume de muco ácido e neutro armazenado nas células secretoras na superfície epitelial foi determinada pela contagem de pontos (Weibel, 1990). Na superfície epitelial, a frequência de células secretoras e ciliadas foi determinada pela contagem de pontos. Foram contados 10 campos/lâmina.

O número de pontos que acertaram cada tipo de muco e a área de células secretoras e não secretoras do epitélio foi contado em cada lâmina. Calculamos o número de pontos correspondente à área total do epitélio em

cada lâmina. A proporção do volume das mucosubstâncias ácidas e neutras foi calculada como se segue (Weibel, 1997):

$$(1) \text{ Proporção do volume da mucosubstância} = P_m/P_t,$$

Onde P_m = número de pontos que acertam a mucosubstância (ácida ou neutra), e P_t = número total de pontos que acertam o epitélio.

A proporção do volume foi expressa em porcentagem.

Foi calculada a média da proporção do volume de cada estrutura analisada do número total de lâminas analisadas para cada grupo.

Realizamos análise histopatológica qualitativa das amostras de tecido pulmonar, traquéia e nariz dos camundongos normais e submetidos ao protocolo de sensibilização por ovoalbumina.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA) e os gráficos foram elaborados por auxílio do Programa Sigma-Plot 4.0. Foi considerada diferença significativa quando o valor de p foi menor que 0,05.

Para as amostras paramétricas utilizamos o teste t de Student e para as não paramétricas utilizamos o teste de Mann-Whitney. As representações gráficas correspondem à média e erro padrão da média.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Com o objetivo de validarmos as medidas da frequência de batimento ciliar (FBC) neste modelo, realizamos medidas antes e após a inalação de solução salina 0,9% (SALINA), acetilcolina (Ach 10^{-3} M) e capsaicina (CAPS $3 \cdot 10^{-3}$ M), uma substância cilioexcitatória conhecida, em animais *naïve* (Figura 11). Observamos que o método aplicado na mensuração da FBC é adequado, já que observamos que a inalação com capsaicina $3 \cdot 10^{-3}$ M por 5 minutos aumentou a FBC ($p < 0,05$) comparada ao valor basal (Controle positivo), comportamento não observado após a inalação de solução salina 0,9% e acetilcolina na concentração de 10^{-3} M.

A comparação entre os valores basais de FBC dos animais controle (CONTROLE) e animais com inflamação de vias aéreas (OVA) ($n=28$ em cada grupo) não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,792$), e a média de ambos foi de aproximadamente 16 Hz (Figura 12).

Figura 11 - Valores (médias $\pm$ erro padrão) da Frequência de Batimento Ciliar (FBC), basais e após inalação de solução salina 0,9% por 15 minutos, de acetilcolina na concentração de 10^{-3} M por 15 minutos e capsaicina $3 \cdot 10^{-9}$ M por 5 minutos. * $p=0,014$, comparado ao basal.

Figura 12 - Valores basais (médias $\pm$ erro padrão) da Frequência de Batimento Ciliar (FBC), de animais controle e com inflamação de vias aéreas (OVA).

Ao analisarmos os animais controle (CONT) e com inflamação crônica de vias aéreas (OVA), notamos que a inalação de salbutamol nas concentrações de $3,5 \cdot 10^{-3}$ M e $3,5 \cdot 10^{-4}$ M mostrou um aumento estatisticamente significativo na frequência de batimento ciliar tanto nos animais controle quanto nos animais com inflamação de vias aéreas ($p < 0,05$, Figura 13).

Figura 13 - Valores (médias $\pm$ erro padrão) basais e após inalação de salbutamol nas concentrações de $3,5 \cdot 10^{-3}$ M e $3,5 \cdot 10^{-4}$ M, da frequência de batimento ciliar (FBC) de animais controle e com inflamação de vias aéreas (OVA) (* $p < 0,05$).

A inalação de Brometo de Ipratrópio nas concentrações de 10^{-4} M e 6.10^{-4} M não alteraram a frequência de batimento ciliar (Figura 14).

Figura 14 - Valores (médias $\pm$ erro padrão) da Frequência de Batimento Ciliar (FBC), de animais controle e com inflamação de vias aéreas (OVA), basais e após inalação de ipratrópio nas concentrações 10^{-4} M e 6.10^{-4} M.

Em relação à medida da diferença de potencial transepitelial, o grupo OVA apresentou aumento significativo nos valores basais de PD na traquéia comparativamente aos animais do grupo CONTROLE ($p=0,013$) (Figura 15).

As fotomicrografias de microscopia eletrônica de traquéia de camundongos do grupo controle e do grupo OVA mostram a preservação das *tight junctions* nos grupos estudados (Figuras 16 e 17).

Figura 15 - Média dos valores da diferença de potencial transepitelial medidos na traquéia de camundongos controle e sensibilizados com ovoalbumina (OVA) (* $p = 0,013$).

Figura 16 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica mostrando as *tight junctions* (seta) em traquéia de camundongo do grupo controle.

Figura 17 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica mostrando as *tight junctions* (seta) em traquéia de camundongo do grupo com inflamação crônica de vias aéreas.

A figura 18 apresenta a análise celular do lavado broncoalveolar realizado nos animais do grupo CONTROLE e do grupo OVA. O grupo OVA apresentou maior número de eosinófilos, quando comparado aos animais do grupo CONTROLE. Isso indica a presença de significativa resposta inflamatória pulmonar nos animais do grupo OVA no momento das medidas de frequência de batimentos ciliar e da diferença de potencial transepitelial.

Figura 18 - Contagem do número de células inflamatórias presentes no lavado broncoalveolar

As figuras 19, 21 e 23 mostram a morfometria da superfície do epitélio respiratório realizadas no nariz (região do septo), traquéia e vias aéreas distais.

Figura 19 - Os animais do grupo OVA apresentam um aumento significativo de células secretoras e mucinas ácidas na cavidade nasal comparado ao grupo CONTROLE(* $p < 0,001$).

Gráfico 11 -

Figura 20 - Fotomicrografias de microscopia óptica da cavidade nasal de camundongos (coloração PAS/AB) (aumento de 1000X) dos grupos controle (A) e com inflamação crônica de vias aéreas (B).

Figura 21 - Os animais OVA apresentam um aumento significativo de células secretoras e mucinas neutras na traquéia comparado ao CONTROLE (* $p < 0,001$).

Figura 22 - Fotomicrografias de microscopia óptica de traquéia de camundongos (coloração PAS/AB) (aumento de 1000X) dos grupos controle (A) e com inflamação crônica de vias aéreas (B).

Figura 23 - Os animais OVA apresentam um aumento significativo de células secretoras e mucinas ácidas e neutras nas vias aéreas distais comparado ao CONTROLE (* $p < 0,001$).

Figura 24 - Fotomicrografias de microscopia óptica de tecido pulmonar de camundongos (coloração PAS/AB) (aumento de 200X) dos grupos controle (A) e com inflamação crônica de vias aéreas (B).

Observamos também nas Fotomicrografias da cavidade nasal (Figura 20), traquéia (Figura 22) e de vias aéreas distais (Figura 24) de camundongos dos grupos controle (A) e submetidos ao protocolo de sensibilização por ovoalbumina (B), coradas pela combinação de ácido periódico de Schiff (PAS) e Azul Alciano (AB) (pH 2,5), sinais sugestivos de hiperplasia/hipertrofia de células secretoras e aumento de mucinas armazenadas, predominantemente AB⁺ na cavidade nasal enquanto que nas vias aéreas distais a maioria são PAS⁺.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm sido feitos no sentido de desenvolver formas de avaliar o transporte mucociliar através de modelos experimentais. No entanto, esses experimentos são realizados em sua maioria *in vitro*, em cultura de células epiteliais ciliadas, sobre o epitélio ciliado de palato de rã ou em vias aéreas de animais *in situ*. (Stewart, 1948, Sade e cols, 1970 e 1975; King e cols, 1974; Lopez-Vidriero, 1985; Negri e cols, 1987; Festa e cols, 1985^a, 1985b, 1987, 1996^a, 1996b; Lorenzi e cols, 1992; King e cols, 1998; Macchione e cols 1998, Agu 1999; Frohock 2002).

Nosso intuito inicial foi desenvolver um modelo experimental *in vivo* para investigação do transporte mucociliar em um modelo animal de asma, capaz de permitir mensurações em um animal pequeno frente inalação de drogas. Além disso, poucos foram os trabalhos que estudaram de forma sistemática o *transporte* mucociliar em modelos experimentais de asma *in vivo* (Wanner e cols, 1975) ou frente à inalação de medicamentos utilizados na terapêutica da asma (Iravani e cols, 1972; As e cols, 1974; Sackner e cols, 1977; Verdugo e cols, 1980; Hybbinette e cols, 1982; Hybbinette e cols, 1982; Devalia e cols, 1992; Wong e cols, 1988).

Optamos pela utilização de camundongos por serem animais de pequeno porte, baixo custo e de fácil manutenção e serem animais de escolha para o estudo da asma devido a proximidade com a doença em seres humanos, incluindo produção de anticorpos específicos IgE, aumento de mastócitos, de linfócitos T e infiltrado tecidual eosinofílico, citocinas Th2,

e hiperresponsividade a broncoconstritores não específicos (Khai e cols 2001; Kips e cols 2003).

Para produzir o modelo, um antígeno é injetado via parenteral para induzir uma sensibilização sistêmica e o mesmo antígeno é administrado pelas vias aéreas (via nebulização ou colocação pela cavidade nasal), o foco do processo inflamatório.

Os camundongos mais utilizados nesses estudos são os BALB/c e C57BL/6 por apresentarem maior responsividade de vias aéreas.

No entanto, após estudo piloto utilizando as linhagens de camundongos BALB-c e *Swiss*, optamos por este último por apresentar maior tamanho (até 50 g) o que possibilitou melhor visualização da traquéia para a mensuração da FBC e PD. Além disso, realizamos um estudo piloto utilizando o protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina, modificada de Kasahara e cols 2004 e nos certificamos da resposta inflamatória nesses animais ao observarmos eosinofilia no lavado broncoalveolar e broncoconstrição e recrutamento de células inflamatórias no tecido pulmonar, observados por microscopia ótica.

Após a escolha do animal, iniciamos a procura por um anestésico que fosse capaz de manter o animal em respiração espontânea por aproximadamente 30 minutos, e que não causasse depressão no aparelho mucociliar. Realizamos estudos com a utilização de Hypnol 3% (pentobarbital sódico) 70 mg/kg, por via intraperitoneal; tiopental sódico, 50 mg/kg por via ip; cetamina (Ketalar), 25 mg/kg e xilazina (Rompum), 5 mg/kg por via ip; e cetamina (Ketalar) e xilazina (Rompum) nas doses de 50 mg/kg

e 40 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, que foram escolhidas por apresentarem o efeito desejado por até 60 minutos.

Para nos certificarmos do estabelecimento do modelo de mensuração da frequência de batimento ciliar *in vivo* e demonstrarmos a responsividade do mesmo, realizamos a inalação de capsaicina em animais *naïve*, uma substância de ação cilioexcitatória conhecida.

A capsaicina foi demonstrada por Wong e cols (1990) aumentar a FBC em traquéia de cães *in vivo* quando inalados na concentração de $3 \cdot 10^{-9}$ M. Resultados similares foram obtidos em nosso modelo na mesma concentração (Controle Positivo).

Assim, nosso estudo demonstrou que é possível mensurar *in vivo*, em traquéia de camundongos, a frequência de batimento ciliar, componente do transporte mucociliar, que em média mostrou-se 16 Hz. A observação limitou-se aos primeiros 15 minutos após a exposição da traquéia e/ou após a inalação de drogas, para que não houvesse interferência do tempo de exposição nas medidas.

Em seguida, após concluirmos o protocolo de sensibilização, comparamos a FBC basal dos animais controle e com inflamação pulmonar alérgica crônica. Podemos dizer que a disfunção mucociliar neste modelo animal de asma não é causada por uma queda da frequência de batimento ciliar, uma vez que não há diferença estatisticamente significativa na FBC entre o grupo controle e o grupo sensibilizado.

Estudos realizados com β_2 -agonistas bastante utilizados no tratamento da asma tem demonstrado que estes agentes são potentes broncodilatadores e, além disso, podem exibir propriedades como a inibição de mediadores inflamatórios, atenuação da reatividade das vias aéreas e aumento do transporte mucociliar. As células da superfície epitelial das vias aéreas e as glândulas submucosas expressam receptores β adrenérgicos, e as células ciliadas do epitélio respiratório, bem como as células mucosas e serosas das glândulas submucosas podem responder a estimulação β -agonista pela produção de AMP cíclico (Lazarus, 1984 e Barne, 1983).

Em nosso estudo, o β_2 agonista de curta ação estudado, o salbutamol, nas concentrações de $3,5 \cdot 10^{-4}$ M e $3,5 \cdot 10^{-3}$ M elevou a frequência de batimento ciliar nos animais controle e também nos animais com inflamação de vias aéreas. O aumento da FBC exprime a velocidade das ondas metacronais de cílios que se movem sobre o epitélio, auxiliando o transporte mucociliar. Esses achados concordam com os de Devalia e cols (1992), em que o salbutamol na concentração de 10^{-4} M aumentou a FBC *in vitro* em cultura de células epiteliais brônquicas de seres humanos, do nível basal de $8,6 \pm 0,4$ para $9,6 \pm 0,5$ Hz após 2 horas de incubação. Os mesmos autores também estudaram o transporte mucociliar *in vitro*, em cultura de células epiteliais brônquicas de pacientes que se submeteram à cirurgia pulmonar, após exposição aos β_2 adrenérgicos salbutamol e salmeterol. O salbutamol na concentração de 10^{-4} M causou um transitório, mas estatisticamente significativo aumento na FBC, após 2 horas de incubação (Devalia e cols, 1992).

A estimulação da FBC pelos β -agonistas provavelmente se deve a ativação da proteína cinase A (PKA) por uma cascata de sinalização envolvendo receptores β -agonistas, adenil ciclase e AMPc e o mecanismo molecular pelo qual a PKA aumenta a FBC em mamíferos é análoga a estimulação da atividade ciliar em *Paramecium*.

Hamasaki e cols, 1989 e 1991, mostraram que PKA fosforilada aumenta a velocidade de deslizamento do microtubulo através da camada de dineína *in vitro* e aumenta a velocidade de natação do *Paramecium in vivo*.

Em nosso estudo, o brometo de ipratrópio nas concentrações de 10^{-4} M e 6.10^{-4} M não alterou a FBC, tanto em animais controle como em animais com inflamação alérgica crônica de vias aéreas. Vários estudos têm mostrado que uma administração única de brometo de ipratrópio (dose de 160 μ g) ou administrações em longo prazo (dose de 200 μ g por dia) falharam em deprimir o transporte mucociliar em indivíduos normais e em pacientes com asma ou bronquite crônica (Borum e cols, 1979, Pavia e cols 1979, Pavia, e cols 1980, Ruffin e cols 1978, Konietzko e cols 1974, Francis e cols 1977). No estudo de Iravani 1972, o ipratrópio na concentração de 10^{-3} g/ml, mostrou deprimir minimamente a freqüência de batimento ciliar, menos que 20% em via aérea de ratos.

As células epiteliais da vias aéreas regulam a profundidade do fluído periciliar pelo transporte ativo de Na^+ e Cl^- e desempenham importante papel no transporte mucociliar. Diariamente essas células são bombardeadas por poluição, antígenos estranhos, agentes nocivos e

microorganismos. Em resposta a esses inúmeros estímulos, o epitélio das vias aéreas tem liberado citocinas inflamatórias e pro inflamatórias e quimiocinas. As citocinas liberadas por células residentes e recrutadas nas vias aéreas como Interleucina 4, Interleucina 13 e Interferon γ produzem mudanças na função de barreira epitelial e secreção de eletrólitos (Yang e cols, 2002) e juntamente com os fatores de crescimento liberados pelas células epiteliais das vias aéreas contribuem para o processo de reparação e remodelamento observado na asma (Holgate e cols, 2003).

Nos animais sensibilizados com ovoalbumina foi observada macroscopicamente grande quantidade de muco respiratório após a abertura da traquéia. Para que os mesmos sobrevivessem durante o procedimento de mensuração da FBC a secreção foi aspirada através de uma seringa conectada a um cateter, sempre na região distal da abertura e sem que o epitélio fosse perturbado. Esta secreção de muco pode ser observada através das fotomicrografias da cavidade nasal, traquéia e tecido pulmonar na coloração PAS-AB. A seqüência PAS-AB cora as substâncias ácidas do muco em azul e as neutras em vermelho. Os polissacarídeos ácidos corados em azul ou púrpura no pH de 2,5 incluem o ácido hialurônico, sialomucinas e quase todas as muco-substâncias sulfatadas mais fortemente ácidas; os mucopolissacarídeos corados em vermelho com o azul alciano em pH 2,5 e PAS incluem muco-substâncias neutras e algumas acidófilas mascaradas (Jones e cols 1973).

A análise histológica do epitélio mostrou sinais sugestivos de hiperplasia/hipertrofia de células secretoras e aumento na produção e

armazenamento do muco, além de mucinas predominantemente AB+ na cavidade nasal enquanto que nas vias aéreas distais a maior parte é constituída de PAS+.

Em relação às propriedades bioelétricas do epitélio respiratório, as medidas da diferença de potencial transepitelial são utilizadas para estudar a integridade da membrana epitelial das ligações entre as células do epitélio, como por exemplo, as junções intercelulares do epitélio respiratório, além de mostrar a capacidade do epitélio na regulação dos fluídos (Knowles e cols, 1981; Welsh, 1987). A abertura das junções intercelulares do epitélio respiratório pode permitir que os antígenos atinjam a musculatura e a lâmina própria com maior facilidade. As fotomicrografias de microscopia eletrônica da traquéia dos animais mostraram que as junções intercelulares encontravam-se íntegras neste modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.

Nosso modelo permitiu estudar *in vivo* a diferença de potencial transepitelial no epitélio traqueal de camundongos com inflamação de vias aéreas induzida por ovoalbumina (OVA). Para validarmos a mensuração da PD traqueal, durante o protocolo, mensuramos a PD no palato e língua do animal, que sabidamente é bastante negativa, e não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Verificamos que a PD medida no epitélio traqueal estava diminuída nos animais do grupo exposto ao protocolo de sensibilização e indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina ($p = 0,013$), sendo esses resultados semelhantes aos do estudo de Cloutier 2004, que demonstrou uma menor

diferença de potencial transepitelial (PD), corrente de curto circuito e resistência do tecido em cultura de células traqueais de camundongos (C57BL/6J) sensibilizados à ovoalbumina (OVA) com períodos de inflamação de 3 dias de aerossol (OVA-3) e 10 dias (OVA-10), em comparação a células epiteliais de animais naive. As cultura de células dos camundongos sensibilizados mostrou ainda maior inibição na absorção de sódio em resposta ao amiloride. Na presença da rede de absorção do cloreto, o aumento na absorção de sódio observado na cultura de células dos animais OVA-10 pode resultar em diminuição do deslocamento de água para a luz das vias aéreas levando à desidratação do muco.

As mudanças observadas na PD associadas à não elevação da frequência de batimento ciliar no grupo com inflamação de vias aéreas, representam uma importante característica do estado alérgico neste modelo murino de doença alérgica das vias aéreas, e podem facilitar a retenção de muco resultando em um epitélio com características similares ao observado nas vias aéreas de fibrose cística (Zabner e cols, 1998).

As células epiteliais podem ter um papel não apenas na homeostase mas também na geração e manutenção da inflamação da via aérea. A liberação de mediadores inflamatórios na asma determina aumento da secreção de mucinas respiratórias, que podem estar com suas propriedades reológicas alteradas reduzindo a eficiência do batimento ciliar e portanto, a habilidade do sistema mucociliar de retirar do local agentes patogênicos e substâncias nocivas.

Durante a realização deste estudo procuramos desenvolver um processo para a medida do transporte mucociliar neste modelo, através da determinação da taxa de deslocamento de partículas na traquéia com a utilização de um microscópio óptico contendo uma lente reticulada. No entanto, após a experimentação de micropartículas de grafite, plástico, alumínio, gel e corante concluímos que este modelo não mostrou-se apto para esta medida.

Este estudo confirma o papel do epitélio das vias aéreas no modelo de inflamação pulmonar induzido por ovoalbumina e oferece a possibilidade de investigar detalhadamente os mecanismos pelos quais as mudanças no transporte de membrana ocorrem e a interação entre o epitélio das vias aéreas e outras células pulmonares no desenvolvimento e perpetuação da inflamação das vias aéreas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1) Nosso estudo demonstrou que é possível desenvolver um modelo experimental em traquéia de camundongos com e sem inflamação de vias aéreas para o estudo *in vivo* da frequência de batimento ciliar.

2) Não há diferenças significativas na frequência de batimento ciliar de camundongos controle e com inflamação de vias aéreas. No entanto, a diferença de potencial transepitelial no epitélio traqueal diminui neste modelo de inflamação de vias aéreas induzido por ovoalbumina.

3) O salbutamol aumenta a frequência de batimento ciliar *in vivo* em traquéia de camundongos controle e com inflamação de vias aéreas e o ipratrópio não altera a FBC nesses grupos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Agu RU, Jorissen M, Willems T, Van den Mooter G, Kinget R, Augustijns P. Effects of pharmaceutical compounds on ciliary beating in human nasal epithelial cells: a comparative study of cell culture models. *Pharm Res.* 1999;16:1380-1385.

Allegra L, Fabbri LM, Picotti G, Matolli S. Bronchial epithelium and asthma. *Eur Respir J Suppl.* 1989; 6:460s-468s.

Anderson MP, Sheppard DN, Berger HA, Welsh MJ. Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am J Physiol.* 1992; 263:1-14.

As AV. The role of selective β_2 -adrenoceptor stimulants in the control of ciliary activity. *Respiration.* 1974;31:146-151.

Barne PJ, Basbaum CB. Mapping of adrenergic receptors in the trachea by autoradiography. *Exp Lung Res.* 1983, 5:183-92.

Barroso FC, Lorenzi-Filho G, Carvalho CRR, Pimentel M, Boueri FV, Barbas Filho JV. Transporte de eletrólitos no epitélio respiratório dos portadores de fibrose cística. *Rev Hosp Clin FMSP.* 1992; 47 v. (2), p.76-78.

Baum GL, Priel Z, Roth Y, Liron N, Ostfeld EJ. *Cilia, mucus and mucociliary interactions*. 1a ed. New York: Marcel Dekker; 1998.

Bateman JRM, Pavia D, Sheahan NF, Newman SP, Clarke SW. Effects of terbutaline sulphate aerosol on bronchodilator response and lung mucociliary clearance in patients with mild stable asthma. *Br J Clin Pharmacol*. 1983; 15:695-700.

Berger J, Albert RE, Sanborn k, Lippmann M. Effects of atropine and methacholine on deposition and transport of inhaled particles in the donkey. *J Toxicol Environ Health* 1978; 4: 587-604.

Blari A, Woods A. The effects of isoproterenol, atropine and disodium cromoglycate on ciliary motility and mucous flow measured in vivo in cats. *Br J Pharmacol*. 1969; 35: 379-389.

Booth BH, Patterson R, Talbot CH. Immediate-type hypersensitivity in dogs: cutaneous, anaphylactic, and respiratory responses to ascaris. *J Lab Clin Med*. 1970; Aug 76(2):181-189.

Borum P, Mygind N, Schultz LF. Intranasal ipratropium: a new treatment for perennial rhinitis. *Clin Otolaryngol*. 1979; 4: 407-411.

Boucher RC, Bromberg PA, Gatzky JT. Airway transepithelial electric potential in vivo: species and regional differences. *J Appl Physiol*. 1980;48(1): 169-176.

Boucher RC. Human airway ion transport – part one. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:271-281.

Braga PC. In vivo observation and counting methods for ciliary motion. In: Braga PC, Allegra L. eds. *Methods in bronchial mucology*. New York: Raven Press 1988;269 – 276.

Braga PC. Methods for investigation of mucus: multidisciplinary approach. Allegra L, Braga PC. eds. *Bronchial mucology and related diseases* . New York: Raven Press. 1990; 13-26.

Bubert HM, Warner CG. Fatal asthma. *JAMA* .1935;104:1469-1472.

Bulbring E, Burn JH, Shelley HJ. Acetylcholine and ciliary movement in the gill plates of *mytilus edulis*. *Proc R Soc Lond [Biol]*. 1953;141:445-466.

Burton JDK. Effect of dry anesthetic gases on the respiratory mucous membrane. *Lancet*. 1962;1:235-238.

Buys J, Wever R, Ruitenberg EG. Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the in vitro killing of new born larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunology*. 1984; 51:601-607.

Camner P, Philipson K. Urban factor and tracheobronchial clearance. *Arch Environ Health*. 1973;27:81-84.

Chanez P, Vignola AM, Vic P, Guddo, Bonsignore G, Godard P, Bousquet P. Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:588-595.

Chopra SK. Effects of atropine on mucociliary transport velocity in anesthetized dogs. *Am Rev Respir Dis* 118: 367-371, 1978

Craige BJ. Fatal bronchial asthma. *Arch of Int Med*. 1941;67: 399-410.

Davis PB. Cystic fibrosis from bench to bedside (editorial). *N Eng J Med*. 1991; 325: 575-577.

Daviskas E, Anderson SD, Gonda I, Chan K, Cook P, Fulton R. Changes in mucociliary transport during and after isocapnic hyperventilation in asthmatic and healthy subjects. *Eur Respir J*. 1995;8:742-751.

Devalia JL, Sapsford RJ, Rusznak C, Toumbis MJ, Davies RJ. The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro. *Pulmonary Pharmacology*. 1992; 5:257-263.

Dulfano MJ, Luk CK. Sputum and ciliary a inhibition in asthma. *Thorax*. 1982 v.17, p.69-72.

Dunnill MS. The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol* 1960; 13:27-33

Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JA. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis, and in emphysema. *Thorax*. 1969;24:176-180.

Ellul-micallef, R. History of asthma. In: Barnes PJ, Grunstein MM, Leff Ar, Woolcock AJ. *Asthma*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997;v.1, p.9-25.

Fahy FV. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; v164, p. S46-S51

Festa E, Macchione M, Paiva PSO, Saldiva PHN, King M. Effects of aerosolized amiloride on mucociliary transport velocity and transepithelial potential difference in isolated frog palate. *J Aerosol Med*. 1985a; v.8, p. 167 – 176.

Festa E, Saldiva PHN, King M. Role of exosurf on mucociliary velocity, transepithelial potential difference and rheology in isolated frog palate. *Eur Respir J*. 1985b; v. 8, p. 297s.

Festa E, Guimarães E, Macchione M, Saldiva PHN, King M. Acute effects of uridine 5'- triphosphate on mucociliary transport in isolated frog palate. *J Aerosol Med*. 1987;v.10,p. 25-39.

Festa E, Feng W, Saldiva PHN, King M. Dose-response study with benzamil on mucociliary velocity, transepithelial potential difference and rheological properties on frog palate. *Eur Respir J*. 1996a;v.9, p.414s.

Festa E, Feng W, Saldiva PHN, King M. *The freshly excised frog palate: a model for studying ion transportation*. XII Intl Cf Congr, Jerusalem, June 1996b.

Fowler k. Necropsy studies on two patients dying of asthma. *Penn Med Jour*. 40:720-724,1937

Foster WM, Bergofsky EH, Bohning DE, Lippmann M, Albert RE. Effect of adrenergic agents and their mode of action on mucociliary transport in man. *J Appl Physiol* 1976;41: 146-152.

Foster WM, Langenback EG, Bergofsky EH. Lung mucociliary function in man: interdependence of bronchial and tracheal mucus transport velocities with lung transport in bronchial asthma and healthy subjects. *Ann Occup Hyg* 1982; 26:227-244.

Francis RA, Thompson ML, Pavia D, Douglas RB. Ipratropium bromide: mucociliary transport rate and airway resistance in normal subjects. *Br J Dis Chest* 1977; 71: 173-178.

Frohock JL, Wijkstrom-Frei C, Salathe M. Effects of albuterol enantiomers on ciliary beat frequency in ovine tracheal epithelial cells. *J Appl Physiol* 2002;10:1152.

Hamasaki T, Mutaugh TJ, Satir BH, Satir P. In vitro phosphorylation of *Paramecium* axonemes and permeabilized cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989;12:1-11.

Hamasaki T, Barkakow K, Richmond J, Satir P. In vitro phosphorylation of *Paramecium* axonemes and permeabilized cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989;12:1-11.

Hybbinette JC, Mercke U. A method for evaluating the effects of pharmacological substances on mucociliary activity in vivo. *Acta Otolaryngol.* 1982; 93:151-159.

Hybbinette JC, Mercke U. Effects of sympathomimetic agonists and antagonists on mucociliary activity. *Acta Otolaryngol.* 1982;94:121-130.

Hilding AC. The relation of ciliary insufficiency to death from asthma and other respiratory diseases. *Annals Of Otology, Rhinology And Laryngology.* 1943; v. 52, p. 5-19.

Holgate ST, Davies DE, Puddicombe S, Richter A, Lackie P, Lordan J, Howarth P. Mechanisms of airway epithelial damage: epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *Eur Respir J Suppl.* 2003 Sep;44:24s-29s.

Houston Jc, De Navasquez S, Trounce JR. A clinical and pathological study of fatal cases of status asthmaticus. *Thorax* 1953;8:207-213

Huber HL, Koessler KK. Patology of bronchial asthma. *Arch of Int Med.* 1922; 30:689-760.

Inness IR, Nickerson M. Drugs inhibiting the action of acetylcholine on structure innervated by postganglionic parasympathetic nerves (antimuscarinic or atropinic drugs). In: Goodman LS, Gilman A. Eds. *The basis of therapeutics.* New York: Macmillan, 1970; 524-548.

Iravanni J. Wirkung einiger bronchodilatierender substanzen auf die flimmeraktivitat unter besonderer berucksichtigung von berotec. *Int J Clin Pharmacol.* 1972;4(suppl): 20-24.

James AL, Carroll N. Theoretic effects of mucus gland discharge on airway resistance in asthma. *Chest.* 1995;107:110.

James AL, Elliot JG, Abramson MJ, Walters EG. Time to death, airway inflammation and remodeling in fatal asthma. *Eur Respir J.* 2005; 26(3):429-34.

Jeffery, PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:S14-S20

Jeffery, PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma: an ultraestructural quantitative study and correlation with hyperreativity. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1745-1753

Jones R, Reid I. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br Med Bull.* 1973;34:9-16.

Jorgensen JV. Patologisk-anatomiske undersogelser hos 3 patienter dode under asthma anfald samt et lethalt tilfaelde af "sekretorisk asthma". *Blibiotek for laeger* 1936; 128:217-266.

Kasahara DI. β_2 -agonista como imunomodulador da resposta inflamatória pulmonar crônica induzida em camundongos sensibilizados com ovoalbumina [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Khai PL, Huston DP. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. *Annals of Allergy, asthma & immunology* 2001;87:96-110.

King M, Gilboa A, Meyer FA, Silberberg A. On the transport of mucus and its rheologic simulants in ciliated system. *Am Rev Respir Dis.* 1974; v.110, p. 740-745.

King M, Festa E. Evolution of the frog palate model for mucociliary transport - 1970 – 1997. *Ciliar, mucus and mucociliary interactions*. 1a ed. New York: Marcel Dekker, 1998.

Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman Md, Jordana M, Kemeny DM, Lötvall J, Pauwels, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout, AJM, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J* 2003, 22: 374-382.

Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The nature of frog skin potential. *Acta Physiol Scan.* 1958; 42: 298-308.

Konietzko N, Muller N, Adam WE. Studies of mucociliary clearance following the use of atrovent by healthy individuals and patients with chronic bronchitis.

Wien Med Wochenschr. 1974; 124 (supl 21): 15-19.

Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Eng J Med*, 1981; 305:489-495.

Kumar, RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. *Pharmacol Ther* 2001;92:93-104

Lacaz-Vieira F, Procópio J. Comparative roles of voltage and Cl ions upon activation of a Cl conductive pathway in toad skin. *Pflügers Arch.* 1988; 412:634-640.

Laitinem LA, Heino M, Laitinem A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:599-606

Lamson RW, Butt EM. Fatal "asthma". Clinical and pathological consideration of 137 cases. *JAMA.* 108:1843-1850 (may.) 1937.

Lansley AB, Sanderson MJ, Dirksen ER. Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by Ca^{2+} and camp. *Am J Physiol.* 1992; v.263, p.232-242.

Lazarus SC, Basbaum CB, Gold WM. Localization of cAMP in dog and cat trachea: effects of β -adrenergic agonists. *Am J Physiol* 1984;247:C327-34.

Liedtke CM. Regulation of chloride transport in epithelia. *Annu Rev Physiol*. 1989; 51: 143 – 160.

Lopez-Vidriero MT, Reid L. Bronchial mucus in health and disease. *Brit Medical Bulletin*. 1978; 34:63-74.

Lopez-Vidriero MT. Airway mucus. *Chest* 1981;80:799-804.

Lopez-Vidriero MT, Jacobs M, Clark SW. The effects of isoprenaline on the ciliary activity of an in vitro preparation of rat trachea. *Eur J Pharmacol* 1985;112:429-432.

Lorenzi G, Bohm GM, Guimarães ET, Costa VMA, King M, Saldiva PHN. Correlation between rheologic properties and in vitro ciliary transport of rat nasal mucus. *Biorheology* 1992; v.29, p 433-440.

Lundgren R. Scanning electron microscopic studies of bronchial mucosa before and during treatment with beclometasone dipropionate inhalations. *Scan J Respir Dis*. 1977; (suppl 101):1557-1561.

Macchione M, Lorenzi-Filho G, Guimarães ET, Junqueira VBC, Saldiva PHN. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radical Biology & Medicine*. 1998; 24:714-721

Macdonald IG. Local and constitutional pathology of bronchial asthma. *Annals of Int Med*. 1932; 6:253-277.

Messina MS, O'riordam TG, Smaldone GC. Changes in mucociliary clearance during acute exacerbations of asthma. *Am Rev Resp Dis*. 1991; v. 143, p.993-997.

Michael PP, Rowe AH. Patology of two fatal cases of bronchial asthma *J of Allergy* 6:150-174 (jan.) 1935.

Mossberg B, Strandberg K, Philipson K, Camner P. Tracheobronchial clearance in bronchial asthma: response to beta-adrenoceptor stimulation. *Scand J Respir Dis* 1976; 57:119-28.

Motojima S, Frigas E, Loegering DA, Gleich GJ. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am Rev Respir Dis*. 139:801-805, 1989.

Naylor B. The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. *Thorax* 1962;17:69-72

Negri EM, Komatsuzaki M, Sakae RS. Alterações do epitélio respiratório e poluição. *Jornal de Pneumologia*. 1987; v.13, p.13-20.

NIH (National Institute of Health). National heart, lung and blood Institute. National asthma education and prevention program. Expert panel report 2- Guidelines for the diagnosis and management of asthma. *NIH*, 1998; publication 98-4051.

NIH (National Institute of Health). National heart, lung and blood Institute. National asthma education and prevention program. Update on selected topics 2002. Expert panel report - Guidelines for the diagnosis and management of asthma. *NIH*, 2003; publication 02-5074.

Pavia D, Thompson ML. Inhibition of mucociliary clearance from the human lung by hyoscine. *Lancet*. 1971; 1:449-450.

Pavia D, Bateman JRM, Shehan NF, Clarke SW. Effect of ipratropium bromide on mucociliary clearance and pulmonary function in reversible airways obstruction. *Thorax* 1979; 34:501-507.

Pavia D, Bateman JRM, Shehan NF, Clarke SW. Clearance of lung secretions in patients with chronic bronchitis. *Eur J Respir Dis* 1980; 61: 245-253.

Pavia D, Bateman JRM, Shehan NF, Agnew JE, Clarke SW. Tracheobronchial mucociliary clearance in asthma: impairment during remission. *Thorax*. 1985; v. 40, p.171-175.

Puchelle E, Polu JM, Zahm JM, Sadoul P. Role of the rheological properties of bronchial secretions in the mucociliary transport at the bronchial surface. *Eur J Respir Dis*. 1980; v. 61 (suppl. 111), p. 29-34.

Rabinovith A, Ravinovith R. A simple model of light transmission through metachronally moving cilia. *J Appl Rhys*. 1990; v. 67, p.1108-1112.

Rennard SI, Romberger DI, Robbins RA, Spurzem JR. Is asthma a epithelial disease? *Chest* 1995;107:127-131.

Rio EM, Gallo PR, Reis AO. Mortalidade por asma no municipio de São Paulo, 1993-1995: análise por causa múltipla de morte. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(05): 1541-1544.

Ruffin RE, Wolff RK, Dolovich MB, et al. Aerosol therapy with sch 1000: short-term mucociliary clearance in normal and bronchitic subjects and toxicology in normal subjects. *Chest* 1978; 73:501-506.

Sackner MA, Chapman GA, Dougherty RD. Effect of nebulized ipratropium bromide and atropine sulfate on tracheal mucus velocity and lung mechanics in anesthetized dogs. *Respiration* 1977; 34:181-185.

Sadé J, Meyer FA, King M, Silberberg A, Nero AC. The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Resp Dis* 1970; v.102, p.48-52.

Sadé J, Meyer FA, King M, Silberberg A. Transport of middle ear effusions by the mucociliary system. *Acta Otolaryngol.* 1975; v.79, p.277-283.

Saldiva, PHN. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. *Jornal de Pneumologia.* 1990; 16(3): 161-170.

Salto JJ, Pagliaro H, Sole D, Naspitz CK. Mortalidade por asma no estado de São Paulo, Brasil: 1970-1994. *Rev Ped Pern.* 1997; v 10, p 51.

Santa Cruz R, Landa J, Hirsch J, Sackner MA. Tracheal mucous velocity in normal man and patients with obstructive lung disease; effects of terbutaline. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109:458-63.

Satir P, Sleigh MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Ann Rev Physiol.* 1990; v. 52, p. 137-155.

Serafini SM, Michaelson ED. Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1977; 13:551-559.

Shafazand S, Colice G. Asthma: the epidemic has ended, or has it? *Chest* 2004; 125(6):1969-1970.

Sly RM. Continuing decrease in asthma mortality in the united states. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004; 92(3): 313-8.

Steinberg B, Figley KD. Pathology of asthma: nonbacterial allergic and bacterial types based on autopsy material. *Njour. of Lab. And Clin Med.* 1928; 13:921(july).

Shafazand S, Colice G. Asthma: the epidemic has ended, or has it? *Chest* 2004; 125(6): 1969-70.

Stewart WC. Weight-carrying capacity and excitability of excised ciliated epithelium. *Am J Physiol* 1948; 152:1-5.

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; 163:721-730.

Verdugo P, Johnson NT, Tam PY. β -adrenergic stimulation of respiratory ciliary activity. *American Physiological Society*. 1980; 868-871.

Wanner A, Zarzecki S, Hirsch J, Epstein S. Tracheal mucous transport in experimental canine asthma. *J Appl Physiol*. 1975; v. 39, p 950-957.

Wanner A. Clinical aspects of mucociliary transport. *Am Rev Respir Dis*. 1977; v.116, p.73-125.

Wanner A, Sielczak M, Mella JF, Abraham WM. Ciliary responsiveness in allergic and nonallergic airways. *American Physiological Society*. 1986; 1967-1971.

Weibel ER, Cruz-Orive LM. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. 1990; 258(4 Pt 1): L148-56.

Welsh, MJ. Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol Rev*. 1987; 67(4): 1143-1184.

Whiteside ME, Lauredo I, Chapman GA, Ratzan KR, Abraham WM, Wanner A. Effect of atropine on tracheal mucociliary clearance and bacterial counts. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1984; 20:347-351.

Wills PJ, Suarez MJA, Rutman A, Wilson R, Cole P. The ciliary transportability of sputum is slow on the mucus-depleted bovine trachea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151, 1255-8.

Wills PJ, Hall RL, Chan W, Cole P. Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea. *J Clin Invest*. 1997; v 99, p 9-13.

Winters SL, Yeates DB. Interaction between ion transporters and the mucociliary transport system in dog and baboon. *J Appl Physiol* 1997; 83:1348-1359.

Wong LB, Miller IF, Yeates DB. Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo. *J Appl Physiol*. 1988; 65(2): 971-981.

Wong LB, Miller IF, Yeates DB. Stimulation of tracheal ciliary beat frequency by capsaicin. *J Appl Physiol*. 1990; 68(6): 2574-2580.

Yang H, Kiristioğlu I, Fan Y, Forbush B, Bishop DK, Antony PA, Zhou H, Teitelbaum DH. Interferon-gamma expression by intraepithelial lymphocytes results in a loss of epithelial barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition. *Ann Surg*. 2002; 236:226-234.

Zabner J, Smith JJ, Karp PH, Widdicombe JH, Welsh MJ. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell* 1998; 2:397-403.

Zund G, Madara JL, Dzusz AL, Awtrey CS, Colgan SP. Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem*. 1996; 271:7460-7464.