TATIANA LANÇAS

**Caracterização das fases imediata e tardia da
resposta inflamatória de tecido pulmonar
periférico de cobaias sensibilizadas**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff

SÃO PAULO

2006

TATIANA LANÇAS

**Caracterização das fases imediata e tardia da
resposta inflamatória de tecido pulmonar
periférico de cobaias sensibilizadas**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof. Dra. Marisa Dolhnikoff

**SÃO PAULO
2006**

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
1. 1. ASMA	02
1.1.1. DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E MORTALIDADE	02
1.1.2. QUADRO CLÍNICO, ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO	03
1.1.3. FISIOPATOLOGIA	05
1.2. RESPOSTAS IMEDIATA E TARDIA	11
1.3. TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS	19
3.2. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO	21
3.3. AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO PARÊNQUIMA PULMONAR	23
3.4. ESTUDO MORFOMÉTRICO	26

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
4.1. TEMPO DE INALAÇÃO	31
4.2. MECÂNICA DO TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO	32
4.3. ESTUDO MORFOMÉTRICO	34
4.4. CORRELAÇÃO MORFOMÉTRICA-FUNCIONAL	38
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8. APÊNDICE	67
ARTIGO REFERENTE A ESTE ESTUDO PUBLICADO NO JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY EM MAIO DE 2006	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado do mecanismo regulatório das células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2)	06
Figura 2 – Esquema de alguns mecanismos fisiopatológicos das fases imediata e tardia da asma	08
Figura 3 – Esquema do protocolo de sensibilização	22
Figura 4 – Desenho esquemático do protocolo experimental e da mecânica do tecido pulmonar periférico	25
Figura 5 – Foto do equipamento de análise da mecânica oscilatória	26
Figura 6 - Esquema da avaliação morfométrica	28
Figura 7 – Tempo de inalação	32
Figura 8 – Valores de resistência basais e após desafio com ovoalbumina e acetilcolina	33
Figura 9 - Valores de elastância basais e após desafio com ovoalbumina e acetilcolina	34
Figura 10 – Densidade de eosinófilos das vias aéreas	35
Figura 11 – Densidade de eosinófilos das fatias de tecido pulmonar periférico	36
Figura 12 – Proporção de volume de colágeno das fatias de tecido pulmonar periférico	37
Figura 13 – Fotomicrografias de fatias de parênquima pulmonar (infiltração eosinofílica e densidade de colágeno)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correlação entre os valores de mecânica e a morfometria dos grupos controle e imediato	39
Tabela 2 – Correlação entre os valores de mecânica e a morfometria dos grupos tardios 1 e 2	40

Lanças T. *Caracterização das fases imediata e tardia da resposta inflamatória de tecido pulmonar periférico de cobaias sensibilizadas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

O parênquima pulmonar periférico tem sido estudado como um componente da resposta inflamatória na asma. Durante uma constrição induzida, a resistência do tecido aumenta em diferentes modelos de asma. Aproximadamente 60% dos pacientes asmáticos possuem respostas imediata e tardia. A resposta tardia é caracterizada por obstrução mais grave de vias aéreas. No presente estudo, foi avaliada a mecânica de fatias de parênquima pulmonar em cobaias sensibilizadas com ovoalbumina (OVA), tentando reproduzir ambas as repostas imediata e tardia. A mecânica oscilatória de fatias pulmonares foi realizada em um grupo controle (C), em um grupo de resposta imediata (IM) e em dois grupos de resposta tardia: 17 (T1) e 72 (T2) horas após o último desafio com ovoalbumina. Medidas de resistência (R) e elastância (E) foram obtidas antes e depois do desafio com OVA nos grupos C e IM e antes e depois do desafio com Acetilcolina (ACh) em todos os grupos. Com o uso de morfometria, foram avaliadas as densidades de eosinófilos e de células musculares lisas, assim como o conteúdo de colágeno e elastina nas fatias pulmonares. Os valores de R e E basais e pós-agonista estão aumentados nos grupos IM, T1 e T2 quando comparados com o grupo C ($p = 0.001$). A análise morfométrica mostrou um aumento na densidade de eosinófilos nas fatias de tecido periférico dos grupos IM e T2 quando comparados com o grupo C ($p < 0.05$). Houve uma correlação positiva significativa entre a densidade de eosinófilos nas fatias de parênquima dos grupos C, T1 e T2 e os valores de R e E pós-ACh

($r=0,71$, $p=0.001$ e $r=0,74$, $p<0.001$, respectivamente). Os resultados mostram que o parênquima pulmonar está envolvido na resposta tardia deste modelo de inflamação alérgica crônica e que a resposta constritora nesta fase está relacionada à inflamação eosinofílica.

Lancas T. *Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pigs parenchymal lung strips* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

The peripheral lung parenchyma has been studied as a component of the asthmatic inflammatory response. During induced constriction, tissue resistance increases in different asthma models. Approximately 60% of the asthmatic patients show early and late responses. The late response is characterized by more severe airway obstruction. In the present study, we evaluated lung parenchymal strips mechanics in ovalbumin-sensitized guinea pigs, trying to reproduce both early and late inflammatory responses. Oscillatory mechanics of lung strips were performed in a control group (C), in an early response group (ER), and in two late response groups: 17 (L1) and 72 (L2) hours after the last ovalbumin challenge. Measurements of resistance and elastance were obtained before and after ovalbumin challenge in C and ER groups and before and after Acetylcholine challenge in all groups. Using morphometry, we assessed the density of eosinophils and smooth muscle cells, as well as collagen and elastin content in lung strips. The baseline and post-agonist values of resistance and elastance were increased in ER, L1 and L2 groups compared with C ($p = 0.001$). The morphometric analysis showed an increase in alveolar eosinophil density in ER and L2 groups compared with C group ($p < 0.05$). There was a significant correlation between eosinophil density in parenchymal strips of C, L1 and L2 groups and values of resistance and elastance post-Acetylcholine ($r = 0.71$, $p = 0.001$ and $r = 0.74$, $p < 0.001$, respectively). The results show that the lung parenchyma is involved in the late response of this guinea pig

model of chronic allergic inflammation and the constriction response in this phase is related to the eosinophilic inflammation.

INTRODUÇÃO

1.1. ASMA

1.1.1. DEFINIÇÃO, PREVALÊNCIA E MORTALIDADE

Segundo a Iniciação Global para Asma - Global Initiative National of Asthma, a doença é definida como: *“uma doença inflamatória crônica de vias aéreas em que diversas células e elementos celulares desempenham um importante papel. A inflamação crônica causa um aumento na hiperresponsividade das vias aéreas que leva a episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e pela manhã. Esses episódios estão geralmente associados à obstrução difusa, porém variável ao fluxo aéreo que é frequentemente reversível tanto espontaneamente quanto com tratamento”* (GINA, 2002).

A asma representa um sério problema de saúde pública mundial, pois, afeta pessoas de todas as idades, pode ser grave e algumas vezes fatal. A prevalência da doença vem aumentando em várias regiões do mundo, principalmente entre as crianças (GINA, 2002). O aumento da prevalência da asma pode estar relacionado com a poluição atmosférica ambiental (Just et al., 2006), com um maior número de diagnósticos decorrentes de definições mais precisas, um maior conhecimento da patogenia ou até mesmo pelo menor estigma associado à doença.

Anualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo SUS (2,3% do total) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens. Em 2004, os custos do

SUS com internação por asma foram de 106 milhões de reais, 1,6% do gasto total anual e o quinto maior valor gasto com uma doença (III Consenso Brasileiro no manejo da asma, 2002).

Um estudo multicêntrico (International Study for Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC) realizado em 56 países mostrou uma variabilidade de asma ativa de 1,6% a 36,8%, estando o Brasil em 8º lugar, com uma prevalência média de asma em crianças de 20% (ISAAC, 1998).

A mortalidade por asma, embora baixa (2.408 óbitos no Brasil, em 2002), tem demonstrado aumento crescente em diversos países e regiões. Nos países em desenvolvimento, a mortalidade por asma vem aumentando nos últimos 10 anos, correspondendo a 5-10% das mortes por causa respiratória, com elevada proporção de óbitos domiciliares (III Consenso Brasileiro no manejo da asma, 2002).

1.1.2. QUADRO CLÍNICO, ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

O quadro asmático, em geral, é clinicamente caracterizado por episódios de broncoconstrição aguda associada ou não à hipersecreção das vias aéreas que levam a sintomas específicos como falta de ar, sibilos e tosse. Essas crises são geralmente reversíveis com ou sem a administração de um broncodilatador (GINA, 2002).

Vários são os estímulos que podem desencadear a hiperresponsividade observada na asma como, por exemplo, alérgenos, fumaça de cigarro, poluentes atmosféricos, fármacos, alterações na temperatura ambiental, infecções

respiratórias, estímulos ocupacionais, substâncias presentes em alimentos, obesidade, exercício físico e estresse (GINA, 2002).

O tipo de estímulo que desencadeia a crise asmática é diferente para os indivíduos que possuem asma atópica (alérgica) ou não atópica (não alérgica). Além disso, observa-se que nem todas as pessoas expostas aos mesmos estímulos desenvolvem a doença. A este fato associa-se claramente a predisposição genética que tem sido amplamente estudada e enfatizada como principal fator para o desenvolvimento da resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) a alérgenos inalatórios comuns (NIH, 1997; GINA, 2002).

Considerando-se a limitação ao fluxo aéreo e sua variabilidade, a asma é classificada, segundo o GINA em 4 diferentes estágios:

1) **Intermitente**: presença de sintomas menos de 1 vez por semana, exacerbações curtas, presença de sintomas noturnos no máximo 2 vezes por semana, volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) = 80% do predito e variabilidade do VEF_1 <20%; 2) **Persistente leve**: presença de sintomas mais do que uma vez por semana e menos de 1 vez ao dia, exacerbações podem afetar as atividades e o sono, presença de sintomas noturnos mais do que 2 vezes por mês, VEF_1 = 80% do predito e variabilidade do VEF_1 entre 20 e 30%; 3) **Persistente moderado**: presença de sintomas diariamente, exacerbações podem afetar as atividades e o sono, presença de sintomas noturnos mais do que 1 vez por semana, uso diário de β -2 agonista de curta duração (broncodilatador), VEF_1 entre 60 e 80% do predito e variabilidade do VEF_1 > 30% e 4) **Persistente grave**: sintomas diários, exacerbações freqüentes, sintomas noturnos também freqüentes, limitação das atividades físicas, VEF_1 = 60% do predito e variabilidade do VEF_1 >

30%. Atualmente a classificação da asma também considera se o paciente ainda não recebeu tratamento específico ou se já está em tratamento (GINA, 2002).

1.1.3. FISIOPATOLOGIA

O desenvolvimento da crise e a relação desta com o fator desencadeante têm sido mais amplamente estudados nos indivíduos atópicos. O processo de sensibilização da doença provavelmente representa a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático. Os alérgenos inalados entram em contato com a mucosa respiratória e são capturados por células dendríticas presentes no epitélio brônquico. Estas células são capazes de reconhecer, processar o antígeno e apresentar seus fragmentos peptídicos ligados à molécula do “Major Histocompatibility Complex Class II” (MHC II) aos linfócitos T auxiliares. Estes vão produzir um padrão de citocinas, sobretudo de interleucinas (IL) (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) que caracterizam uma resposta predominantemente humoral, induzindo a proliferação de linfócitos do subtipo “T helper 2” (Holgate, 1993). Por meio de um mecanismo regulatório (Figura 1), o interferon-gamma (IFN- γ) produzido pelas células T helper 1 (Th1) inibe as células T helper 2 (Th2), e a interleucina 4 (IL-4) produzida pelas células Th2 inibe as células Th1 (Husain e Kumar, 2005). Um desequilíbrio que favoreça as células Th2 pode ser importante na asma como, por exemplo, a descoberta de Schwartz de que os linfócitos brônquicos de pacientes com asma não possuem o fator de transcrição T-bet que é importante na produção do IFN- γ pelas células Th1 (Schwartz, 2002).

FIGURA 1. Esquema simplificado mostrando o mecanismo regulatório das células T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). A diferenciação entre Th1 e Th2 depende das interleucinas 12 (IL-12) e interleucina 4 (IL-4), citocinas produzidas por células T CD4 estimuladas por antígenos (Adaptado de *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*, 2005).

As citocinas produzidas pelos linfócitos T fazem com que estas células estimulem a produção de imunoglobulinas (IgE) por linfócitos B, além de estimular a proliferação de mastócitos e ativação e aumento da sobrevivência de eosinófilos. Os anticorpos liberados na circulação se ligam a receptores de alta afinidade presentes em mastócitos (Harris et al., 1995). Quando ocorre uma reexposição ao antígeno, este se liga à IgE nos mastócitos e estas células, então, liberam mediadores pré-formados que atuam abrindo as junções entre as células epiteliais. O antígeno pode então, entrar na mucosa para ativar mastócitos e eosinófilos que, por sua vez, liberam mais mediadores. Conjuntamente, tanto por via direta ou por reflexos neuronais, os mediadores induzem broncoespasmo, aumento da

permeabilidade vascular e produção de muco e recrutam do sangue mais células secretoras de mediadores inflamatórios (Husain e Kumar, 2005). Esta reação ocorre em cerca de metade dos pacientes asmáticos e na maioria dos modelos experimentais. É denominada reação imediata, ou seja, ocorre minutos após a exposição do indivíduo ao antígeno e é caracterizada, fundamentalmente, por obstrução de vias aéreas. O principal fator responsável pela obstrução de vias aéreas nesta fase é a contração da musculatura lisa brônquica, porém, outros fatores estão envolvidos, como a formação de edema das vias aéreas e hipersecreção de muco (Figura 2). Embora os mastócitos liberem histamina e prostaglandina (PG) D₂, os leucotrienos parecem ser os principais mediadores responsáveis pelas alterações encontradas nesta fase (Harris et al., 1995).

A chegada de leucócitos recrutados (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e também linfócitos e monócitos) sinaliza o início da fase tardia da asma e ocorre horas após a exposição antigênica. Nesta fase, ocorre a liberação de mediadores produzidos por leucócitos, pelo endotélio e por células epiteliais (Figura 2). Fatores, principalmente de eosinófilos (por exemplo, a proteína básica principal e a proteína catiônica eosinofílica), também causam danos ao epitélio (Husain e Kumar, 2005).

FIGURA 2. Esquema representando alguns mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas fases imediata e tardia da asma alérgica (Adaptado de *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*, 2005).

Os indivíduos asmáticos podem ser assintomáticos no período entre as crises, mas apesar disso, sabe-se atualmente, através de estudos com biópsias brônquicas e lavados broncoalveolares (LBA) de pacientes asmáticos, que a inflamação está presente em intensidade variável mesmo nos intervalos entre as crises. Esses estudos também mostram que a inflamação está presente na via aérea de indivíduos asmáticos mesmo na asma leve e em casos subclínicos (Beasley et al., 1989).

Entre as várias células que participam do processo inflamatório na asma, estudos demonstram que o linfócito T e o eosinófilo atuam como células fundamentais para a perpetuação do processo inflamatório. Existe uma correlação entre a gravidade da doença e os linfócitos T ativados e eosinófilos no lavado broncoalveolar (Walker et al., 1991). Os linfócitos T de vias aéreas asmáticas são, em sua maioria, CD3+, CD45 RO+ e CD4+, indicando que são células T “helper” com exposição prévia a antígeno. Apesar disso, tem sido demonstrado que linfócitos T CD8 também são capazes de produzir IL-4 e IL-5 em pacientes asmáticos (Ying et al., 1997; Cho et al., 2002). Alguns estudos inclusive, retrataram maior expressão de IL-4 e Interferon-gama (INF- γ) por células CD8 em casos de asma fatal comparados a controles. Os autores atribuem esse achado a provável infecção viral associada (O’Sullivan et al., 2001).

Os eosinófilos, considerados como células efetoras de papel fundamental na asma, estão presentes nas vias aéreas de pacientes asmáticos em quantidades variáveis. Essas células são praticamente ausentes em vias aéreas de indivíduos normais. São recrutados da circulação numa fase tardia da inflamação. A produção e ativação dos eosinófilos estão sob controle dos linfócitos T auxiliares: IL-3, IL-5 e GM-CSF constituem fatores de crescimento, diferenciação e ativação de eosinófilos. Essas células têm papel efetor, liberando proteínas altamente tóxicas de seus grânulos (proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, endoperoxidase neutra, neurotoxina derivada do eosinófilo) e radicais livres de oxigênio que vão causar dano tecidual (Holgate, 1993). A proteína catiônica eosinofílica (ECP) presente na matriz dos grânulos e que apresenta atividade citotóxica contra o epitélio brônquico está presente em quantidade aumentada no

epitélio e na submucosa de pacientes asmáticos, quando comparado aos controles (Azzawi et al., 1990; Bousquet et al., 1990; Djukanovic et al., 1990). Os eosinófilos produzem também mediadores lipídicos que vão amplificar a resposta inflamatória através do recrutamento e ativação de mais células (Auchinlos et al., 1997). A lesão do epitélio brônquico facilita a penetração de alérgenos e favorece a exposição de terminações nervosas com subsequente liberação de neuropeptídeos pelas fibras C sensitivas que compõem o sistema nervoso autônomo não-adrenérgico não-colinérgico e atuam como potentes mediadores do processo inflamatório das vias aéreas (Holgate, 1993).

A participação dos neutrófilos na fisiopatologia da asma brônquica é pouco conhecida. Em alguns casos de asma fatal tem sido reportada a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico (Fujisawa et al., 1990). Sur et al. (1993) relataram aumento do número de neutrófilos e escassez de eosinófilos nos pacientes com morte súbita por asma. Há evidências de que neutrófilos desempenhem importante papel na hipersecreção por meio da elastase presente em seus grânulos. Estes possuem um papel importante na secreção de células caliciformes e glândulas submucosas das vias aéreas (Nadel e Takeyama, 1999). Outros autores, entretanto, não mostraram correlação significativa entre o número de neutrófilos presentes no tecido periglandular e a área de muco na luz das vias aéreas (Carrol et al., 1996).

Por outro lado, Lamblin et al. (1998) evidenciaram aumento de neutrófilos em lavado brônquico de pacientes com crise grave de asma submetidos a ventilação mecânica quando comparados a asma leve e controles não asmáticos. O aumento de neutrófilos em asmáticos graves corticodependentes comparados a

asmáticos moderados foi também documentado por Wenzel et al. (1997) através de material obtido de biópsia endobrônquica e transbrônquica. Esse achado poderia estar associado a altas doses de corticosteróide utilizadas, a uma eventual infecção respiratória concomitante ou a um perfil específico de asma grave. Esse mesmo grupo de pesquisadores evidenciou, posteriormente, maior número de neutrófilos na submucosa brônquica de asmáticos graves comparados a asmáticos leves e controles. Além disso, ao caracterizarem dois grupos distintos de asma grave baseado na presença e ausência de eosinófilos, não encontraram diferença no número de neutrófilos entre eles (Wenzel et al., 1999).

1.2. RESPOSTAS IMEDIATA E TARDIA

A reação pulmonar a antígenos em indivíduos sensíveis pode ser caracterizada como uma resposta imediata isolada, tardia isolada ou uma associação de ambas as respostas (Subbarao et al., 2005; Babu e Arshad, 2001). Indivíduos atópicos com asma apresentam broncoconstrição que, geralmente, tem um pico após 2 horas após a exposição ao alérgeno (resposta asmática imediata). Em aproximadamente 60% dos indivíduos, essa broncoconstrição também ocorre de 3 a 7 horas depois, caracterizando a resposta asmática tardia, que está associada com a hiperresponsividade brônquica e a inflamação eosinofílica das vias aéreas (Yoshida et al., 2005). A obstrução das vias aéreas durante a resposta tardia é mais prolongada e geralmente mais grave do que a observada na resposta imediata (O'Byrne, 1998).

A hiperresponsividade a histamina foi medida em um estudo antes e após 24 horas ao desafio do antígeno. A resposta a histamina não mudou nos pacientes que desenvolveram uma resposta imediata isolada, entretanto, os pacientes que desenvolveram uma resposta imediata e tardia demonstraram aumentos significantes na reação a histamina 24 horas após o desafio. Esse aumento na responsividade foi persistente em alguns pacientes por semanas seguidas ao desafio indicando que, dentro do estudo da patogênese da asma, a resposta tardia é de grande relevância (Bousquet et al., 1990).

1.3. TECIDO PULMONAR PERIFÉRICO

Alguns estudos têm sugerido que a resposta inflamatória na asma não está restrita às vias aéreas, mas ocorre difusamente nos pulmões. O parênquima pulmonar periférico de pacientes asmáticos apresenta inflamação eosinofílica, assim como hiperexpressão de IL-5 (de Magalhaes Simoes et al., 2005; Kraft et al., 1996, Minshall et al., 1998). A obstrução ao fluxo de ar, característica na asma, provoca um aumento da resistência pulmonar que é um fator determinante para o gasto de energia que ocorre durante a respiração. Grande parte dessa resistência é determinada pelas vias aéreas, pois a passagem de um fluxo de ar por um sistema de tubos dissipa energia. Porém, tem sido proposto nos últimos anos que o pulmão distal pode ter um papel fundamental na resistência pulmonar total (Bachofen, 1968). Considera-se pulmão distal as vias aéreas com calibre = 2 mm de diâmetro e o parênquima pulmonar adjacente (Tulic e Hamid, 2002). Sugere-se que alterações nas pequenas vias aéreas podem contribuir significativamente para

o declínio funcional na asma, especialmente nos pacientes com asma grave (Enfumosa, 2003; in't Veen et al., 2000). Tem sido observado que o parênquima pulmonar pode também apresentar aumento de resistência durante uma constrição induzida por agonistas em diferentes modelos animais de asma (Homma et al., 2005; Nagase et al., 1995; Tomioka et al., 2002; Xisto et al., 2005). As alterações inflamatórias e funcionais do pulmão distal alertam para a possibilidade da participação do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que mudaria provavelmente alguns conceitos, mas principalmente algumas formas de tratamento da doença, uma vez que, tem sido demonstrado que a maioria dos esteróides inalatórios mais usados atualmente é predominantemente depositada nas vias aéreas centrais e não na periferia pulmonar, o que pode resultar em subtratamento deste compartimento pulmonar nos indivíduos asmáticos (Tulic e Hamid, 2003).

Embora a heterogeneidade de constrição da via aérea possa ser responsável pelas alterações observadas na resistência do tecido em resposta a agonistas (Lutchen et al., 1996), um aumento nessa resistência tecidual pode também refletir um papel direto do parênquima na resposta pulmonar total. O local da resposta contrátil do parênquima alveolado ainda não está totalmente estabelecido. Os mecanismos que podem estar potencialmente envolvidos nesta resposta são: a contração de miofibroblastos ou células intersticiais contráteis (Kapanci et al., 1974, Fukui et al., 1996), alterações mecânicas da matriz extracelular, contração de células musculares lisas ao nível de ductos alveolares (Lai et al., 1994), pequenas vias aéreas ou vasos presentes no tecido pulmonar periférico (Ludwig, 1997).

Inicialmente, muitos estudos de modelos animais foram desenvolvidos para investigar a resposta broncoconstritora imediata a antígenos inalados, porém tem sido proposto o estabelecimento de modelos animais que incorporem ambas as respostas brônquicas imediata e tardia porque os dados epidemiológicos sugerem que os pacientes que desenvolvem respostas tardias a agentes provocadores sofrem de asma mais grave por serem mais sintomáticos e demonstrarem uma hiperresponsividade mais pronunciada (Busse et al., 1995).

Fatias de parênquima pulmonar submetidas a oscilações sinusoidais *in vitro* podem ser usadas com o objetivo de determinar o comportamento mecânico do tecido, uma vez que, elas representam exclusivamente as unidades distais do tecido pulmonar e permitem uma melhor avaliação das propriedades puras do tecido (Fust et al., 2004; Leite-Junior et al., 2003). Estudo prévio realizado com fatias de tecido pulmonar periférico mostrou que o parênquima pulmonar humano responde a acetilcolina com aumento de resistência e elastância. Nesse estudo, não houve diferença na resposta contrátil entre as fatias de tecido pulmonar com ou sem vias aéreas. Esses resultados sugerem que a resposta à acetilcolina ocorre em nível de parênquima pulmonar e independe da presença de vias aéreas no tecido analisado (Dolhnikoff et al., 1998).

Vários modelos de inflamação pulmonar alérgica são descritos na literatura (Yamashita et al., 2006; Careau et al., 2006; Wegmann et al., 2005; Toward e Broadley, 2004). Foi previamente desenvolvido em nosso laboratório um modelo de inflamação pulmonar crônica em cobaias, utilizando-se exposições repetidas a aerossóis de ovoalbumina (duas vezes por semana, por 4 semanas). Neste modelo, os valores máximos de resistência e elastância do sistema respiratório

após a broncoprovocação com o antígeno foram significativamente maiores nas cobaias sensibilizadas quando comparadas aos controles. Os animais sensibilizados apresentaram uma broncoconstrição intensa, edema e inflamação peribrônquicos, e aumento significativo de linfócitos e eosinófilos no fluido do lavado broncoalveolar. A imunohistoquímica com anticorpos monoclonais revelou que a maioria dos linfócitos presentes na parede da via aérea era de células T CD₄⁺. Estes resultados sugerem que este modelo de exposições múltiplas a aerossóis de ovoalbumina reproduz algumas das características da asma humana (Tibério et al., 1997).

Hutson et al. (1988), reproduziram a broncoconstrição imediata e tardia após desafio com alérgeno em cobaias sensibilizadas, e avaliaram a mecânica respiratória dos animais em respiração espontânea. Os resultados mostraram uma resposta imediata em 5 minutos e persistente até 2 horas e outros dois picos de broncoconstrição, um em 17 horas e o outro após 72 horas, sugerindo que este modelo animal possa ser útil para o estudo dos mecanismos envolvidos nas fases imediata e tardia da resposta inflamatória.

Embora estudos prévios tenham demonstrado que o parênquima pulmonar periférico contrai durante a resposta imediata após desafio com antígeno (Nagase et al., 1995), o comportamento mecânico *in vitro* do tecido pulmonar periférico durante as diferentes fases da resposta inflamatória em um modelo de inflamação alérgica crônica não foi descrito anteriormente. No presente estudo foi realizada, portanto, a avaliação do comportamento do tecido pulmonar periférico nas fases imediata e tardia da resposta inflamatória de cobaias sensibilizadas.

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo responder as seguintes questões:

1. A mecânica do tecido pulmonar periférico em um modelo de inflamação pulmonar crônica em cobaias está alterada em relação ao grupo controle?
2. Existe participação do tecido pulmonar periférico na fase tardia da resposta inflamatória neste modelo?
3. Existe diferença do comportamento mecânico do tecido pulmonar periférico entre as fases imediata e tardia da resposta inflamatória neste modelo ?
4. Existe relação entre o grau de resposta do tecido pulmonar periférico a estímulo constritor e a quantidade de células contráteis no parênquima pulmonar?
5. Existe relação entre a mecânica do tecido pulmonar periférico e a inflamação presente no mesmo?
6. Existe relação entre a mecânica do tecido pulmonar periférico e os componentes da matriz extracelular do mesmo?

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram utilizadas cobaias do sexo masculino, da linhagem Hartley, provenientes da empresa MEDLAB Produtos Diagnósticos LTDA (São Paulo, Brasil). Todos os animais receberam cuidados de acordo com o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985), sendo que todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais sob efeito de anestesia geral. Os animais foram mantidos no biotério de manutenção conjunto dos Laboratórios de Investigação Médica LIM-20 e LIM-05 desta Faculdade, recebendo alimento e água *ad libitum*, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído.

O peso dos animais era em média 200 a 250g no início do protocolo de sensibilização. Para este estudo, foram sensibilizados 32 animais. Houve perda de 8 animais durante as inalações.

3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estudadas 24 cobaias divididas em 4 grupos experimentais:

a) Grupo de resposta imediata (IM); n=6: animais que receberam inalações com ovoalbumina (OVA), desafio com OVA 0,1% no banho orgânico e estímulo constritor com acetilcolina (ACh).

b) Grupo de resposta tardia 1 (T1), n=5: animais que receberam inalações com OVA e estímulo constritor com ACh 17 horas após a última inalação;

c) Grupo de resposta tardia 2 (T2); n=6: animais que receberam inalações com OVA e estímulo constritor com ACh 72 horas após a última inalação;

d) Grupo controle (C); n=7: animais que receberam inalações com soro fisiológico 0,9% (solução salina) desafio com OVA 0,1% no banho orgânico e estímulo constritor com acetilcolina (ACh).

3.2. PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO

Os animais foram colocados, um a um, em uma caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (*Soniclear, São Paulo, Brasil*), como demonstrado na FIGURA 3. A seguir, foram submetidos à inalação com aerossol de ovoalbumina (OVA) (*Advanced Nutrition Ltda., Brazil*) diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico - SF) por 15 minutos ou até o aparecimento de sinais de desconforto respiratório tais como tosse, tiragem intercostal, coriza intensa e/ou cianose. Neste momento, os animais eram imediatamente retirados da caixa de inalação e, quando necessário, recebiam oxigênio. O tempo em que os animais permaneceram em contato com o aerossol foi cronometrado e denominado tempo de inalação (TI). O desconforto respiratório ocorreu somente nas inalações em que a concentração de ovoalbumina foi maior do que 1 mg/mL. O observador que decidia pela retirada das cobaias da caixa de inalação não sabia a que grupo os animais pertenciam.

O aerossol foi produzido por um nebulizador ultrassônico que gera partículas cujo diâmetro varia de 0,5 a 10 μm , com taxa de nebulização de 1 mL.min⁻¹. As inalações foram realizadas duas vezes por semana por 4 semanas (Kips et al., 1992; Tibério et al., 1997) com concentrações crescentes de OVA com o objetivo de evitar tolerância. O grupo de resposta imediata foi exposto a um total de sete inalações com aerossol de OVA em concentrações de 1 a 5 mg/ml. Um oitavo desafio com OVA 0,1% foi aplicado às fatias pulmonares diretamente no banho orgânico. Esta dose ótima foi determinada por experimentos preliminares nos quais foram testadas diferentes doses de OVA (0,003 - 0,3%) Os dois grupos de

resposta tardia (T1 e T2) foram expostos a oito inalações com aerossol de OVA em concentrações de 1 a 10 mg/ml. O grupo controle recebeu sete inalações de soro fisiológico 0,9% (Figura 3).

FIGURA 3. Esquema do protocolo de sensibilização. As cobaias foram submetidas a inalações, duas vezes por semana, com doses crescentes de ovoalbumina ou soro fisiológico.

3.3. AVALIAÇÃO DA MECÂNICA DO PARÊNQUIMA PULMONAR

Para a realização da mecânica do tecido pulmonar periférico, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg) intraperitoneal, traqueostomizados, submetidos a laparotomia e receberam 0,1 mL de heparina sódica (5000 U.I./mL, Roche, São Paulo, Brasil) na veia cava inferior. Posteriormente, a mesma foi seccionada para exsangüinação do animal. Os pulmões e o coração foram retirados em bloco e foram então injetados nos pulmões aproximadamente 10mL de solução de Krebs (mM: NaCl, 118; KCl, 4,5; NaHCO₃, 25,5; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; glicose 10; Sigma Chemical, St. Louis, MO). Cortes sagitais de ambos os pulmões foram fixados em formalina 10% por 48 horas, emblocados em parafina e processados como de rotina.

Foram então cortadas fatias pulmonares subpleurais (10 x 2 x 2 mm) dos lobos inferiores e o comprimento de repouso (L_r) e peso úmido (W_0) de cada fatia foram medidos. Clips de metal foram colados com cianocrilato em cada extremidade da fatia. Hastes de aço (0,5 mm de diâmetro) foram acopladas aos clips de metal. Uma extremidade foi conectada a um transdutor de força (modelo 404A; Cambridge Technologies) e a outra extremidade foi conectada a um braço oscilatório servo-controlado (modelo 300B; Cambridge Technologies). O braço oscilatório é capaz de realizar excursões de 8 mm e resoluções de comprimento de 1 μ m e foi, por sua vez, conectado a um gerador (modelo 3030; BK Precision, Chicago, IL) que controla a frequência, a amplitude e a forma de onda das oscilações. A tensão de repouso (T) foi obtida pela movimentação de um parafuso

de microscópio adaptado ao equipamento que realizava lentos deslocamentos verticais do transdutor de força. Os sinais de força e comprimento foram convertidos de analógico para digital com auxílio de um conversor e gravados em um computador compatível. As fatias pulmonares foram pré-condicionadas por ciclos lentos de tensão de 1 a 2 g por três vezes e, após o terceiro ciclo, mantidas sob tensão de 1g no banho orgânico contendo solução de Krebs aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ por 50 minutos para permitir um *stress relaxation*. Durante este tempo, a solução de Krebs foi trocada a cada 15 minutos. A frequência de oscilação foi 1 Hz e a amplitude foi de 2,5% de L_r. Após estes 50 minutos, a tensão final de repouso era aproximadamente 0,8g (Figuras 4 e 5).

Nos grupos controle e resposta imediata as fatias pulmonares foram desafiadas com OVA 0,1% no banho para obtenção de uma resposta máxima (Nagase et al., 1995). Após 10 minutos, a solução de Krebs foi trocada antes da adição de acetilcolina (ACh) 10⁻³ M (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ao banho. Nos dois grupos de resposta tardia, apenas ACh foi adicionada ao banho. Medidas de resistência (R) e elastância (E) basais foram obtidas por 5 minutos, após desafio com OVA nos grupos controle e resposta imediata e após adição de ACh ao banho em todos os grupos.

A resistência e a elastância foram estimadas pela equação (Lauzon e Bates, 1991):

$$(1) \quad T = E \cdot l + R \cdot (dl/dt) + K$$

Onde T = tensão, L = comprimento, $\Delta L/\Delta t$ = é a variação de comprimento por unidade de tempo, e K é uma constante que reflete a tensão de repouso. Os resultados foram padronizados para o tamanho de cada fatia. A área de secção transversal (A_0) da fatia foi obtida pela fórmula:

$$(2) \quad A_0 (\text{cm}^2) = W_0 / (\rho \times L_r)$$

Onde ρ é a densidade de massa do tecido adotada como $1,06 \text{ g cm}^{-3}$, W_0 é o peso úmido em gramas e L_r é a tensão em repouso em cm. Os valores de R e E foram multiplicados por L_r/A_0 . Após a oscilação mecânica, as fatias foram fixadas em formalina 10% por 48 horas e emblocados em parafina para análise histológica.

FIGURA 4. Esquema do protocolo experimental e da mecânica do tecido pulmonar periférico. As fatias de tecido pulmonar periférico foram conectadas a um transdutor de força e a um braço oscilatório e foram suspensas em um banho orgânico (solução de Krebs).

FIGURA 5. Foto do equipamento de análise da mecânica do tecido pulmonar periférico.

3.4. ESTUDO MORFOMÉTRICO

Cortes de 5 μm de espessura das fatias de tecido pulmonar e dos fragmentos pulmonares remanescentes foram corados com hematoxilina e eosina para análise histológica de rotina e com coloração de Luna para marcação de eosinófilos (Luna, 1986; Watanabe et al., 2004). As fatias pulmonares foram também submetidas à imunohistoquímica com anticorpo anti-actina de músculo liso e coradas com Picro-Sirius e Resorcina-Fucsina para avaliação do conteúdo de colágeno e de fibras elásticas respectivamente (Dolhnikoff et al., 1999).

Para a análise imunohistoquímica, os blocos foram desparafinizados e uma solução de peroxidase a 0,5% em metanol foi aplicada por 10 minutos para inibir atividade de peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada com solução citrato por 30 minutos. Os cortes foram incubados com Anti-Actina Humana de Músculo Liso, 1A 4, Dako, Dinamarca *overnight* a 4°C. O kit LSAB®

Plus-HRP (K-0690 DAKO Corporation, Carpinteria, EUA) foi usado como anticorpo secundário e, como cromógeno, foi usado o 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris.

Com o método de morfometria convencional, foi avaliada a densidade de eosinófilos nas vias aéreas dos pulmões e nos septos alveolares das fatias de tecido pulmonar. Utilizando um retículo de 100 pontos (com área de $62,500 \mu\text{m}^2$ no aumento de 400x) acoplado à ocular do microscópio, foi quantificado o número de pontos que incidiam na área externa da parede da via aérea (localizada entre o limite externo da camada de músculo liso e a adventícia). A área externa da via aérea em cada campo foi calculada de acordo com o número de pontos que incidiam nesta área, através de uma proporção da área total do retículo (Figura 6-A). Foi quantificado então o número de eosinófilos naquela área da parede da via aérea. Nas fatias pulmonares, foi quantificado o número de pontos que incidiam no tecido alveolar em cada campo e o número de eosinófilos presentes nos septos alveolares (Figura 6-B). A densidade de eosinófilos foi determinada pelo número de eosinófilos em cada campo dividido pela área de tecido. As medidas foram expressas por células/ μm^2 . Os resultados foram então transformados para células/ mm^2 ajustando-se as unidades (de Magalhaes Simões et al., 2005). A contagem foi feita em 15 campos de vias aéreas e 10 campos de fatia pulmonar em cada animal em um aumento de 400x.

O conteúdo de actina nas fatias pulmonares foi determinado pela proporção entre o número de pontos que caíam nas células actina+ e o número total de pontos que caíam no tecido alveolar (Figura 6-C). O conteúdo de colágeno (Figura

6-D) e de fibras elásticas (Figura 6-E) no tecido alveolar das fatias pulmonares foi determinado também pela proporção entre o número de pontos que incidiam em fibras colágenas ou elásticas e o número total de pontos no septo alveolar. As medidas foram feitas em 10 campos de fatia pulmonar em cada animal em um aumento de 400x. Os resultados foram expressos em porcentagem (proporção de volume).

ESTUDO MORFOMÉTRICO

FIGURA 6. Esquema da avaliação morfométrica da densidade de eosinófilos nas vias aéreas (A) e nas fatias pulmonares (B) e do conteúdo de actina (C), fibras colágenas (D) e fibras elásticas (E) nas fatias de parênquima pulmonar. Um retículo composto de 50 retas e 100 pontos (área conhecida) foi acoplado à ocular do microscópio (aumento de 400X).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS 10.0. O teste Kolmogorov-Smirnov foi aplicado a todas as variáveis do estudo, mostrando que os dados eram paramétricos em sua totalidade. Os parâmetros funcionais pré e pós-agonista em cada grupo foram analisados pelo teste T pareado de *Student* e as comparações dos valores funcionais e morfométricos entre os grupos foi realizada por análise de variância (One-way ANOVA). As comparações múltiplas entre os grupos foram feitas pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão. A correlação de Pearson foi realizada para correlacionar a análise morfométrica e os valores de mecânica pulmonar. O nível de significância foi estabelecido com $p < 0.05$ para todas as análises (Zar, 1984).

RESULTADOS

4.1. TEMPO DE INALAÇÃO

Durante as quatro primeiras inalações, não foram observados sinais de desconforto respiratório em nenhum dos animais estudados. Na figura 7 observamos as médias $\pm$ erro padrão dos valores de tempo de inalação (TI: segundos) correspondentes à quarta, quinta, sexta e sétima inalações dos animais dos grupos controle (C) e imediato (IM) e à quarta, quinta, sexta, sétima e oitava inalações dos grupos tardios (T1 e T2). Todos os animais que receberam inalações com soro fisiológico permaneceram 900 segundos (15 minutos) durante todas as inalações. A partir da quinta inalação houve redução progressiva do tempo de inalação nos animais sensibilizados comparativamente aos animais controle. Na sétima inalação os animais sensibilizados ($300,2 \pm 38,01$ seg.) mostraram valores menores de tempo de inalação comparativamente aos grupos controle que receberam inalações somente com soro fisiológico ($p < 0,001$).

FIGURA 7. Gráfico do tempo de inalação dos animais controle (SAL) e sensibilizados (OVA). As caixas representam a média de tempo de cada inalação e as barras representam a soma de 2 erros padrão em relação à média. (* $p < 0,001$ quando comparado com a quarta inalação).

4.2. Mecânica do tecido pulmonar periférico

As figuras 8 e 9 mostram, respectivamente, os valores de resistência e elastância (basais e após desafio com agonista) nos quatro grupos estudados. Foi observado um aumento nos valores basais de R e E nos três grupos sensibilizados quando comparados ao grupo controle ($p < 0.001$). Após adição de agonista ao banho (OVA nos grupos C e IM, e ACh em todos os grupos), houve um aumento

significativo nos valores de R e E nos grupos IM, T1 e T2 quando comparados ao grupo controle ($p \leq 0.001$). Houve também um aumento significativo em ambos os valores de R e E após desafio com agonista quando comparados aos valores basais em todos os grupos ($p < 0.01$). A intensidade de resposta foi calculada como a porcentagem de aumento de R e E após desafio com agonista em relação aos valores basais. Nenhuma diferença significativa na intensidade de resposta da R e E foi observada após desafio com agonista entre os 4 grupos.

FIGURA 8. Gráfico dos valores de resistência basais, pós-OVA nos grupos controle e imediato e pós-ACh em todos os grupos (* $p \leq 0,001$ quando comparado com sensibilizados; § $p < 0,01$ quando comparado com basal).

FIGURA 9. Gráfico dos valores de elastância basais, pós-OVA nos grupos controle e imediato e pós-ACh em todos os grupos (* $p<0,001$ quando comparado com sensibilizados; § $p<0,01$ quando comparado com basal).

4.3. Estudo Morfométrico

As figuras 10 e 11 mostram, respectivamente, a densidade de eosinófilos nas vias aéreas e nas fatias de parênquima nos quatro grupos experimentais. Foi observado um aumento significativo na densidade de eosinófilos das vias aéreas nos três grupos sensibilizados quando comparados ao grupo controle ($p<0.001$). As fatias pulmonares mostraram um aumento significativo na densidade de eosinófilos nos alvéolos nos grupos IM e T2 quando comparados aos controles ($p<0.05$). A figura 12 mostra a proporção de volume de colágeno nos alvéolos das

fatias pulmonares nos animais controle e sensibilizados. Houve um aumento significativo no conteúdo de colágeno após a sensibilização ($p=0.016$). A figura 13 mostra fotomicrografias representativas da infiltração eosinofílica nos alvéolos e a densidade de colágeno nos animais controles e sensibilizados. Não houve diferença significativa no conteúdo de actina e fibras elásticas das fatias pulmonares entre os animais controle e sensibilizados.

FIGURA 10. Gráfico da densidade de eosinófilos das vias aéreas dos animais controle e sensibilizados (* $p<0,001$ quando comparado com o grupo controle). Densidade expressa em células/mm².

FIGURA 11. Gráfico da densidade de eosinófilos das fatias de tecido pulmonar dos animais controle e sensibilizados (* $p < 0,05$ quando comparados com o grupo controle). Densidade expressa em células/mm².

FIGURA 12. Gráfico da proporção de volume de colágeno nos alvéolos das fatias pulmonares dos animais controle e sensibilizados (* $p=0,016$ quando comparados com o grupo controle). Proporção de volume expressa em porcentagem.

FIGURA 13. Fotomicrografias mostrando infiltração eosinofílica de fatias de parênquima pulmonar (A e B) e densidade de colágeno (C e D) em animais controle (direita) e sensibilizados (esquerda). Os animais sensibilizados mostraram um aumento significativo na infiltração alveolar de eosinófilos e na densidade de colágeno quando comparados aos controles. Escala = 100µm.

4.4. Correlação Morfométrica-funcional

As correlações entre os dados funcionais e a morfometria foram feitas separadamente, ou seja, considerando primeiro a resposta a ovoalbumina e acetilcolina nos grupos C e IM (Tabela 1) e, posteriormente, apenas a resposta inespecífica após desafio com ACh nos grupos C, T1 e T2 (Tabela 2).

Tabela 1: Correlação entre os valores de mecânica e os dados morfométricos dos grupos C e IM (valores de R) *.

PM	Rbasal	Rova	%Rova	Rach	%Rach	Ebasal	Eova	%Eova	Each	%Each
Eosinófilos	0.29 (NS)	0.34 (NS)	0.58 (0.03)	0.24 (NS)	0.10 (NS)	0.30 (NS)	0.32 (NS)	0.47 (NS)	0.30 (NS)	0.11 (NS)
Actina	0.60 (0.02)	0.65 (0.01)	0.61 (0.02)	0.67 (0.01)	0.26 (NS)	0.63 (0.02)	0.66 (0.01)	0.55 (NS)	0.66 (0.01)	0.21 (NS)
Elástica	0.54 (0.05)	0.51 (NS)	0.30 (NS)	0.56 (0.04)	0.20 (NS)	0.58 (0.03)	0.56 (0.04)	0.29 (NS)	0.56 (0.04)	0.02 (NS)

PM = parâmetro morfométrico; Rbasal = resistência basal; Rova = resistência pós-OVA; %Rova = porcentagem de aumento de R pós-OVA; Rach = resistência pós-ACh; %Rach = porcentagem de aumento de R pós-ACh; Ebasal = elastância basal; Eova = elastância pós-OVA; %Eova = porcentagem de aumento de E pós-OVA; Each = elastância pós-ACh; %Each = porcentagem de aumento de elastância pós-ACh; C = controle; IM = imediato.

*Os valores de p estão entre parênteses. NS = não significantes.

Foi observado, portanto, quando avaliados os grupos C e IM, uma correlação significativa entre o conteúdo de actina e os valores de R e E basais, os valores de R e E pós-Ova, os valores de R e E pós-Ach, e a porcentagem de aumento de R pós-Ova. Também houve correlação significativa entre a densidade de eosinófilos no parênquima e a porcentagem de aumento de R pós-Ova. Observamos ainda correlação significativa entre a quantidade de fibras elásticas presentes no tecido e os valores basais e pós-Ach de R, e os valores basais, pós-Ova e pós-Ach de E. Não foram encontradas correlações significativas entre os parâmetros funcionais e o conteúdo de colágeno quando considerados os grupos C e IM.

Tabela 2: Correlação entre os valores de mecânica e os dados morfométricos dos grupos C, T1 e T2 (valores de R) *.

PM	Rbasal	Rach	%R	Ebasal	Each	%E
Eosinófilos	0,72 (0,001)	0,71 (0,001)	0,30 (NS)	0,75 (<0,001)	0,74 (<0,001)	0,19 (NS)
Colágeno	0,82 (<0,001)	0,79 (<0,001)	0,12 (NS)	0,84 (<0,001)	0,83 (<0,001)	0,11 (NS)

PM = parâmetro morfométrico; Rbasal = resistência basal; Rach = resistência pós-acetilcolina; %R = porcentagem de aumento de R pós-acetilcolina; Ebasal = elastância basal; Each = elastância pós-acetilcolina; %E = porcentagem de aumento de E pós-acetilcolina; C = controle; T1 = tardio 1; T2 = tardio 2.

*Os valores de p estão entre parênteses. NS = não significantes.

Quando consideramos os grupos C, T1 e T2, houve correlação entre a densidade de eosinófilos no tecido e os valores de R e E basais e pós-Ach, sugerindo que a resposta tardia neste modelo pode ser dependente da infiltração eosinofílica no tecido. Observamos também correlação significativa entre o conteúdo de colágeno no tecido e os valores de R e E basais e pós-ACh. Não foram encontradas correlações significativas entre os parâmetros funcionais e o conteúdo de actina e fibras elásticas quando considerados os grupos C e de resposta tardia.

DISCUSSÃO

O presente projeto teve como objetivo principal a avaliação da participação do parênquima periférico na resposta tardia num modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica. Os resultados mostram que, neste modelo, a resposta ao estímulo alérgico está presente até 72h após o desafio, havendo participação do tecido pulmonar periférico na fase tardia da resposta, caracterizada pelo aumento da resistência e elastância teciduais basais em T1 e T2 em comparação com controles.

Tem sido demonstrado que a resposta alérgica das vias aéreas pode apresentar um componente tardio que, em muitos casos, é mais importante clinicamente e de tratamento mais difícil que a resposta imediata (O'Byrne, 1998). Estima-se que a resposta tardia ocorra em aproximadamente 50% dos indivíduos asmáticos adultos (Robertson et al., 1974) e entre 70 a 85% das crianças (Van Lookeren et al., 1969).

A principal característica da resposta tardia é um aumento do recrutamento e ativação de eosinófilos, mediados em grande parte por linfócitos T CD4+. A polarização para um padrão de linfócitos Th2 determina a secreção de citocinas específicas, incluindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e GM-CSF (Babu e Arshad, 2001). IL-4, IL-5 e IL-13 têm papel na resposta alérgica dependente de IgE e estão envolvidas no recrutamento e ativação de eosinófilos. Eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos podem participar da resposta tardia; acredita-se que o estímulo responsável pela hiperresponsividade brônquica determine o tipo celular predominante em cada caso (O'Byrne, 1998).

A patogênese da resposta tardia tem sido amplamente estudada. Enquanto a resposta imediata parece ser altamente dependente da liberação de mediadores

por mastócitos, levando à broncoconstrição e edema da via aérea, o desenvolvimento da resposta tardia está associado com o influxo e ativação de outras células inflamatórias na mucosa brônquica, principalmente linfócitos e eosinófilos (De Monchy et al., 1985; Metzger et al., 1987; Robinson et al., 1993; Robinson et al., 1993). Num modelo de asma em camundongos, Cieslewicz et al. (1999) mostraram que IL-5 e eosinófilos são essenciais para o desenvolvimento da fase tardia, mas não da fase imediata da resposta alérgica. O aumento de eosinófilos nas vias aéreas está associado ao aumento de células progenitoras circulantes 24h após a inalação de alérgenos (Gibson et al., 1991), sugerindo que o alérgeno estimule a medula óssea a produzir essas células. A medula óssea responde a IL-5 com aumento da expressão de receptor de IL-5 em células progenitoras (Sehmi et al., 1997). Assim, após inalação do alérgeno, sinais enviados da via aérea à medula óssea, possivelmente mediados por IL-5, aumentam a produção de células progenitoras de eosinófilos e basófilos agindo em progenitores mais responsivos a IL-5, com conseqüente aumento de recrutamento celular nas vias aéreas (O'Byrne, 1998).

Tem sido sugerido que IgE apresenta um papel não só na resposta imediata, mas também na resposta alérgica tardia. Células Th2 alérgeno reativas desempenham um papel central na ativação e recrutamento de células B produtoras de IgE, mastócitos e eosinófilos envolvidos na fase tardia (Babu e Arshad, 2001). O papel da IgE na mediação da resposta alérgica das vias aéreas é confirmado pelo fato de que o tratamento de pacientes asmáticos alérgicos com anticorpos monoclonais anti-IgE atenuou a inflamação eosinofílica nas vias aéreas, aumentou a dose de alérgeno necessária para provocar uma resposta imediata e

reduziu a queda máxima média do VEF₁ durante as respostas imediata e tardia provocadas por desafio com alérgeno (Fahy et al., 1997). Além disso, Peebles et al. (2001) demonstraram que a presença de IgE e IgA alérgeno-específicas pode ser um importante determinante na patogênese da fase tardia. Os indivíduos com níveis detectáveis de anticorpos IgE alérgeno-específicos tiveram uma reação tardia mais proeminente e também tiveram níveis maiores de fibrinogênio no lavado broncoalveolar e de proteína catiônica eosinofílica, marcadores de inflamação nas vias aéreas.

Existem também evidências do papel dos leucotrienos (LT) C4, D4 e E4 na patogênese da resposta alérgica (O'Byrne, 1998). Leucotrienos causam broncoconstrição, aumentam a permeabilidade microvascular e estimulam a secreção de muco (Moloney et al., 2003; Piper et al., 1991). Antagonistas de receptores de LT (Rasmussen et al., 1992; Taylor et al., 1991) e inibidores de síntese de LT (Diamant et al., 1995; Hamilton et al., 1997) atenuam parcialmente as respostas asmáticas imediata e tardia. Alguns autores sugerem que o componente residual de broncoconstrição não atenuado por anti-LT seja mediado pela liberação de histamina (Keyzer et al., 1984; Roquet et al., 1997). Assim, a liberação de histamina e LT por mastócitos resultaria na fase imediata da resposta asmática; como consequência da fase imediata, eosinófilos e mastócitos atraídos para as vias aéreas seriam ativados, causando nova liberação de histamina e LT, determinando a resposta tardia.

O papel do tecido pulmonar periférico na fisiopatologia da asma tem sido intensamente investigado nos últimos anos. Modelos experimentais mostram que a resposta do tecido a alérgenos pode ser tão importante ou até maior que aquela

das vias aéreas (Martins et al., 1993; Sakae et al., 1992). Nagase e colaboradores (1994) avaliaram as propriedades do tecido pulmonar na resposta imediata e tardia de ratos sensibilizados com ovoalbumina num modelo *in vivo* com o uso da cápsula alveolar, mostrando a participação tanto das vias aéreas como do parênquima pulmonar nas duas fases da resposta alérgica. Um outro estudo do mesmo grupo mostrou que o parênquima pulmonar periférico contrai durante a resposta imediata após desafio com antígeno *in vitro* (Nagase et al., 1995). Entretanto, não existem na literatura até o momento, modelos *in vitro* que avaliem exclusivamente o tecido pulmonar na fase tardia. Nossos resultados estão de acordo com aqueles de Nagase et al e mostram que a resposta contrátil do parênquima pulmonar não ocorre somente na fase imediata, mas também na fase tardia. Além disso, a ausência de diferença no percentual de aumento de resistência e elastância após agonista entre os grupos mostra que a magnitude da resposta contrátil é semelhante nas duas fases.

Em nosso estudo, o aumento significativo de eosinófilos nas vias aéreas dos grupos IM, T1 e T2 mostra que a sensibilização à OVA foi efetiva nos grupos estudados. No tecido periférico houve também aumento significativo na densidade de eosinófilos nos grupos de resposta imediata (IM) e resposta tardia 2 (T2) quando comparados ao grupo controle. Esse resultado está de acordo com muitos trabalhos que mostram que a inflamação pulmonar na asma está presente também em nível de parênquima alveolar (Kraft et al., 1996; Wenzel et al., 1997). Nosso grupo demonstrou recentemente em humanos que a inflamação eosinofílica está presente em toda a extensão do trato respiratório, ou seja, desde a mucosa nasal até o parênquima pulmonar periférico em pacientes que foram a óbito por mal

asmático (de Magalhaes Simoes et al., 2005). O fato de que existe inflamação no tecido pulmonar periférico de indivíduos asmáticos aponta para um problema de ordem terapêutica, uma vez que, corticóides inalatórios indicados para o tratamento da asma em geral não conseguem atingir de maneira efetiva as regiões mais distais dos pulmões (Sutherland e Martin, 2002). Conforme demonstrado em nosso estudo, existe uma resposta contrátil do parênquima pulmonar periférico também na fase tardia da resposta inflamatória. Os indivíduos que apresentam essa resposta tardia são, normalmente, os que possuem asma mais grave e que, portanto, necessitam de maiores cuidados terapêuticos.

No presente estudo, caracterizamos uma resposta eosinofílica em todos os grupos sensibilizados (IM, T1 e T2). A correlação positiva entre os valores de R e E e a densidade de eosinófilos no tecido sugere que a resposta tardia e, em menor grau a resposta imediata, são dependentes de inflamação eosinofílica. O mecanismo envolvido na resposta do tecido na presença de inflamação eosinofílica não está totalmente estabelecido, podendo envolver células com características contráteis em pequenas vias aéreas, ductos alveolares e alvéolos (miofibroblastos) (Ludwig e Dallaire, 1994). Nosso grupo demonstrou previamente que a resposta do tecido pulmonar periférico de humanos a acetilcolina não depende da presença de vias aéreas no tecido, apontando para uma resposta predominantemente de ductos e parênquima alveolar (Dolhnikoff et al., 1998). Mediadores eosinofílicos, como LTC₄ e PAF podem induzir broncoconstrição. Tais mediadores poderiam estar envolvidos também na resposta alveolar. É interessante notar em nosso estudo que a resposta do tecido com aumento de R e E teve forte correlação com o conteúdo de actina na fase imediata, e com o grau de inflamação eosinofílica na

fase tardia. Esses resultados sugerem que a fase imediata da resposta é mais dependente da quantidade de células contráteis presentes no tecido, podendo estar também relacionada a mediadores de fase aguda secretados por outras células inflamatórias, como mastócitos, enquanto a fase tardia parece ser resultado de mediadores relacionados ao eosinófilos. A análise dos mediadores inflamatórios envolvidos nas diferentes fases da resposta do parênquima periférico a agonistas traria grande contribuição para o melhor entendimento de sua fisiopatologia.

Os componentes da matriz extracelular determinam em grande parte o comportamento mecânico do tecido pulmonar. Fibras colágenas conferem resistência ao tecido, enquanto a integridade da matriz colágeno-elastina determina suas propriedades elásticas. Tem sido sugerido que o remodelamento de vias aéreas pode ser responsável pela obstrução persistente e declínio da função pulmonar observados em parte dos pacientes com asma. O remodelamento de pequenas vias aéreas parece contribuir significativamente para a perda de função pulmonar nesses pacientes, principalmente naqueles com asma grave (in't Veen et al., 2000, Mauad et al., 2004). No presente estudo, observamos a presença de remodelamento do tecido pulmonar periférico, caracterizado pelo aumento significativo do conteúdo de colágeno nas fatias pulmonares, provavelmente decorrente da inflamação crônica. O conteúdo de colágeno se correlacionou positivamente com os valores de R e E basais e pós-ACh nos grupos de resposta tardia. Apesar de não haver diferença no conteúdo de fibras elásticas entre os grupos, observamos também correlação entre a densidade de fibras elásticas no tecido e os valores de R e E basais e valores de E pós-Ova nos grupos C e IM. Xisto et al. (2005) mostraram recentemente num modelo de asma

crônica em camundongos evidências de remodelamento não só de vias aéreas, mas também do parênquima pulmonar periférico, caracterizado por aumento do conteúdo de colágeno e de actina nas unidades distais do tecido pulmonar. Descrevemos recentemente em humanos, alterações de fibras elásticas em acoplamentos alveolares de vias aéreas distais em pulmões de pacientes com asma fatal. Tais alterações da matriz extracelular periférica podem ser ao menos em parte responsáveis pelas alterações funcionais descritas nesses pacientes, como perda do efeito broncodilatador de uma inspiração profunda, e aumento do fechamento de vias aéreas em episódios de broncoconstrição (Mauad et al., 2004).

Apesar do aumento do conteúdo de colágeno no tecido alveolar não ser descrito em humanos com asma, nossos resultados reforçam a importância das alterações pulmonares periféricas na asma, apontando para um remodelamento não só das vias aéreas, mas também de unidades pulmonares mais distais.

CONCLUSÕES

1. A mecânica do tecido pulmonar periférico neste modelo de inflamação pulmonar crônica em cobaias está alterada em relação ao grupo controle, com aumento da resistência e elâstancia do tecido tanto em situação basal como após o desafio com agonista.

2. Existe participação do tecido pulmonar periférico na fase tardia da resposta inflamatória neste modelo, com aumento da resistência e elâstancia do tecido quando comparado ao grupo controle.

3. O comportamento mecânico do tecido pulmonar em resposta ao estímulo constritor é semelhante nas fases imediata e tardia da resposta inflamatória neste modelo de inflamação pulmonar crônica.

4. Existe correlação entre o grau de resposta do tecido pulmonar periférico a estímulo constritor na fase imediata da resposta e a quantidade de células contráteis presentes no parênquima pulmonar neste modelo de inflamação pulmonar crônica.

5. Ambas as fases imediata e tardia da resposta são caracterizadas por inflamação eosinofílica das vias aéreas e tecido pulmonar periférico neste modelo de inflamação pulmonar crônica.

6. A composição da matriz extracelular tecidual e a inflamação eosinofílica do tecido têm correlação com a mecânica do tecido pulmonar periférico neste modelo de inflamação pulmonar crônica.

1. Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Assouif B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of activated T-lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1407-1413.
2. Auchinlos HJ, Geha RS, Kay AB, Lechler R, Ito YW, Sprent J, Wraith D. Allergy and Hypersensitivity. In: C.A.J. Janeway, P. Travers, S. Hunt, M. Walports. *Immunobiology*. 3rd Edition. New York: Garland Publishing; 1997. p. 11:1-11:25.
3. Babu KS, Arshad SH. IgE – a marker of late asthmatic response? *Clin Exp Allergy* 31 (2): 182-185, 2001.
4. Bachofen H. Lung tissue resistance and pulmonary hysteresis. *J Appl Physiol* 1968; 24: 296 – 301.
5. Beasley R, Roche WR, Roberts JA, Holgate ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 806-817.
6. Bousquet J, Chenez P, Barneon JY, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, Godard P, Michel FB. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 1990; 323: 1033-1039.
7. Busse WW, Coffman RL, Gelfand EW, Kay AB, Rosenwasser LJ. Mechanisms of persistent airway inflammation in asthma. A role for T cells and T-cell products. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(1): 388-93.

8. Careau E, Proulx LI, Pouliot P, Spahr A, Turmel V, Bissonnette EY. Antigen sensitization modulates alveolar macrophage functions in an asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290(5): L871-9.
9. Carrol N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J* 1996; 9(4): 709-15.
10. Cho SH, Stanciu LA, Begishivili T, Bates PJ, Holgate ST, Johnston SL. Peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell type 1 and type 2 cytokine production in atopic asthmatic and normal subjects. *Clin Exp Allergy* 2002; 32 (3): 427-33.
11. Cieslewicz G, Tomkinson A, Adler A, Duez C, Schwarze J, Takeda K, Larson K A, Lee J J, Irvin C G, Gelfand E W. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest* 1999; 104: 301-308.
12. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol* 2002; 28 (Supl 1).
13. De Magalhaes Simoes S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35 (5):602-611.
14. De Monchy JGR, Kauffman HF, and Venge P. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:373-376.

15. Diamant Z, Timmers MC, van der Veen H, Friedman BS, De Smet M, Depre M, et al. The effect of MK-0591, a novel 5-lipoxygenase activating protein inhibitor, on leukotriene biosynthesis and allergen-induced airway responses in asthmatic subjects in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:42-51.
16. Djukanovic R, Wilson JW, Britten, KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. Quantification of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:863-871.
17. Dolhnikoff M, Morin J, Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158:1607-1612.
18. Dolhnikoff M, Mauad T and Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1750 –1757.
19. Enfumosa study group. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 470-477.
20. Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J et al. The effect of IgE monoclonal antibody on the early and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1828-1834.

21. Fujisawa T, Kephart GM, Gray BH, Gleich GJ. The neutrophil and chronic allergic inflammation. Immunohistochemical localization of neutrophil elastase. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(3):689-97.
22. Fukui M, Yasui H, Watanabe K, Fujimoto T, Kakuma T, Yoshida R, Ohi M, Kuno K. Hypoxic contraction of contractile interstitial cells isolated from bovine lung. *Am J Physiol* 1996; 270: L962-L972.
23. Fust A, Bates JH, Ludwig MS. Mechanical properties of mouse distal lung: in vivo versus in vitro comparison. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; 143: 77- 86.
24. Gibson PG, Manning PJ, O'Byrne PM, Girgis-Gabardo A, Dolovich J, Denburg JA, et al. Allergen-induced asthmatic responses. Relationship between increases in airway responsiveness and increases in circulating eosinophils, basophils, and their progenitors. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:331-335.
25. Global Initiative for Asthma. *Global strategy for asthma management and Prevention Program*. National Heart, Lung, and Blood Institute/World Health Organization. Workshop Report. Washington, U.S. Department of Health, Education, and Welfare. 2002. Publication No. 02-3659.
26. Hamilton AL, Watson RM, Wyle G, O'Byrne PM. A 5-lipoxygenase activating protein antagonist, Bay 1005, attenuates both early and late phase allergen-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Thorax* 1997; 52:348-354.
27. Harris RR, Carter GW, Bell RL, Moore JL, Brooks DW. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17: 147-156.

28. Holgate ST. Asthma – Pathophysiology. In: ST Holgate, MK Churchs. *Allergy*. London: Gower Medical Publishing 1993; 13.1-13.12.
29. Homma T, Bates JH, Irvin CG. Airway hyperresponsiveness induced by cationic proteins in vivo: site of action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: 413 - 418.
30. Husain AN, Kumar V. The lung. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic basis of disease*. 7th edition. Elsevier Inc.; 2005.p. 15:723-15:727.
31. Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P, Holgate ST. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea-pigs. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 548- 557.
32. int' Veen JC, Beekman AJ, Bel EH, Sterk PJ. Recurrent exacerbations in severe asthma are associated with enhanced airway closure during stable episodes. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1902- 1906.
33. Just J, Nisakinovic L, Laoudi Y, Grimfeld A. Air pollution and asthma in children. *Arch Pediatr* 2006; May 11; [Epub ahead of print].
34. Kapanci Y, Assimacopoulos A, Irle C, Zwahlen A, Gabbiani G. “Contractile interstitial cells” in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation/perfusion ratio? *J Cell Biol* 1974; 60: 375-392.
35. Keyzer JJ, Kauffman HF, de Monchy JG, Keyzer-Udding JJ, De Vries K. Urinary N tau-methylhistamine during early and late allergen-induced

- bronchial-obstructive reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74:240-245.
36. Kips JC, Cuvelier CA, Powells RA. Effect of acute and chronic inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1306- 1310.
37. Kraft M, Djukanovic S, Wison S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1505- 1510.
38. Lai J, Rogers RA, Ekstein BA, Fredberg JJ. Dynamic changes in alveolar duct geometric in response to 10-3 histamine. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: A538.
39. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, Tonnel AB. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(2): 394-402.
40. Lauzon AM, Bates JH. Estimation of time-varying respiratory mechanical parameters by recursive least squares. *J Appl Physiol* 1991; 71: 1159- 1165.
41. Leite-Junior JH, Rocco PR, Faffe DS, Romero PV, Zin WA. On the preparation of lung strip for tissue mechanics measurement. *Respir Physiol Neurobiol* 2003; 134: 255- 62.
42. Ludwig MS, Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol* 1994; 77(4): 2029- 2035.

43. Ludwig MS. Role of lung parenchyma. In PJ Barnes, MM Grustein, AR Leff, and AJ Woolcock, editors. *Asthma*. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1319-1334, 1997.
44. Luna LG. *AFIP manual of histologic staining methods*. New York: *McGraw Hill*, 1986.
45. Lutchen KR, Greenstein JL, Suki B. How inhomogeneities and airway walls affect frequency dependence and separation of airway and tissue properties. *J Appl Physiol* 1996; 80: 1696- 707.
46. Martins MA, Dolhnikoff M, Zin WA, Saldiva PHN. Airway and pulmonary tissue responses to capsaicin in guinea pigs assessed with the alveolar capsule technique. *Am Rev Resp Dis* 1993; 147: 446-470.
47. Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Abnormal Alveolar Attachments with Decreased Elastic Fiber Content in Distal Lung in Fatal Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170, 857- 862.
48. Metzger WJ, Zavala D, Richerson HB, Moseley P, Iwamota P, Monick M, Sjoerdsma K, Hunninghake GW. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lung: description of the model and local airway inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:433-440.
49. Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 386- 390.

50. Moloney ED, Griffin S, Burke CM, Poulter LW, O'Sullivan S. Release of inflammatory mediators from eosinophils following a hyperosmolar stimulus. *Respir Med* 2003; 97: 928- 932.
51. Nadel JA, Takeyama K. Mechanisms of hypersecretion in acute asthma, proposed cause of death, and novel therapy. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1999; 18: 54-5.
52. Nagase T, Moretto A, Dallaire MJ, Eidelman DH, Martin JG, Ludwig MS. Airway and tissue responses to antigen challenge in sensitized brown Norway rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 218- 226.
53. Nagase T, Fukuchi Y, Dallaire MJ, Martin JG, Ludwig MS. *In vitro* airway and tissue responses to antigen in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 81- 86.
54. National Institute of Health/World Health Organization. National Asthma Education and prevention program. Expert panel Report 2. *Guidelines for the diagnosis and management of asthma*. Washington. U.S. Department of health. Education and Welfare, 1997.
55. O'Byrne P. Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: S85- 89.
56. O'Sullivan S, Cormican L, Faul JL, Ichinohe S, Johnston SL, Burke CM, Poulter LW. Activated, cytotoxic CD8(+) T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(4):560-4.

57. Peebles Jr RS, Hamilton RG, Lichtenstein LM, Schlosberg M, Liu MC, Proud D, Togias A. Antigen-specific IgE and IgA antibodies in bronchoalveolar lavage fluid are associated with stronger antigen-induced late phase reactions. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 239-248.
58. Piper PJ, Conroy DM, Costello JF, Evans JM, Green CP, Price JF, et al. Leukotrienes and inflammatory lung disease. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 629:112-119.
59. Rasmussen JB, Erikson L-O, Margolskee DJ, Tagari P, Williams VC, Andersson K-E. Leukotriene D4 receptor blockade inhibits the immediate and late bronchoconstrictor responses to inhaled antigen in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:193-201.
60. Robertson DG, Kerigan AT, Hargreave FE, Dolovich J. Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1974; 54: 244- 254.
61. Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function and bronchial responsiveness. *Thorax* 1993; 48: 26 –32.
62. Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ cell, increased TH2- type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 313- 324.

63. Roquet A, Dahlen B, Kumlin M, Ihre E, Aanstren G, Binks S, et al. Combined antagonist of leukotrienes and histamine produces predominant inhibition of allergen-induced early and late phase airway obstruction in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1856-1863.
64. Sakae RS, Martins MA, Criado PM, Zin WA, Saldiva PH. In vivo evaluation of airway and pulmonary tissue response to inhaled metacholine in the rat. *J Appl Toxicol* 1992; 12: 235-238.
65. Schwartz RS. A new element in the mechanism of asthma. *N Engl J Med* 2002; 346:857-8.
66. Sehmi R, Wood LJ, Watson R, Foley R, Hamid Q, O'Byrne PM, et al. Allergen induced increases in IL-5 receptor [alpha]-subunit expression on bone marrow derived CD34+ cells from asthmatic subjects: a novel marker of progenitor cell commitment toward eosinophilic differentiation. *J Clin Invest* 1997; 100:2466-2475.
67. Subbarao P, Dorman SC, Rerecich T, Watson RM, Gauvreau GM, O'Byrne PM. Protection by budesonide and fluticasone on allergen-induced airway responses after discontinuation of therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:745-50).
68. Suki B, Ito S, Stamenovic D, Lutchen KR, Ingenito EP. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. *J Appl Physiol* 2005; 98: 1892- 9.

69. Sur S, Crotty TB, Kephart GM, Hyma BA, Colby TV, Reed CE, Hunt LW, Gleich GJ. Sudden-onset fatal asthma. A distinct entity with few eosinophils and relatively more neutrophils in the airway submucosa? [see comments]. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148(3): 713-9.
70. Sutherland ER, Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89: 119 -124.
71. Taylor IK, O'Shaughnessy KM, Fuller RW, Dollery CT. Effect of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist ICI 204-219 on allergen-induced bronchoconstriction and airway hyperactivity in atopic subjects. *Lancet* 1991; 337:690-694.
72. The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in the prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998; 12: 315-35.
73. Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1739 -1747.
74. Tomioka S, Bates JH, Irvin CG. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillation. *J Appl Physiol* 2002; 93: 263- 270.

75. Toward TJ, Broadley KJ. Early and late bronchoconstrictions, airway hyper-reactivity, leucocyte influx and lung histamine and nitric oxide after inhaled antigen: effects of dexamethasone and rolipram. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(1): 91-102.
76. Tulic MK, Hamid Q. The role of the distal lung in asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2002; 23(4): 347-59.
77. Tulic MK, Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. *Chest* 2003; 123 (3 Suppl.): 348- 355.
78. Van Lookeren Campagne, Knol K, De Vries K. House dust provocation in children. *Scand J Respir Dis* 1969; 50: 76-85.
79. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophils in bronchoalveolar lavage from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 935-942.
80. Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N, Sugata Y, Orita Y, Takai T, Nishizaki K. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 105 -112.
81. Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(10): 1263-71.

82. Wenzel SE, Szefer SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 737- 743.
83. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 54(9): 825-57.
84. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PR. Lung parenchymal remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(8): 829- 837.
85. Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, Ishida H, Yoshiura K, Sato K, Yamashita N, Kakiuchi T, Ohta K. Role of CCL21 and CCL19 in allergic inflammation in the ovalbumin-specific murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(5): 1040-6.
86. Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Larche M, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+T cells, eosinophils and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1997; 158(7): 3539-44.
87. Yoshida M, Watson R, Rerecich T, O'Byrne PM. Different profiles of T-cell IFN-gamma and IL-12 in allergen-induced early and dual responders with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(5): 1004- 1009.

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

Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips

Tatiana Lanças, David I. Kasahara, Carla M. Prado, Iolanda F. L. C. Tibério, Milton A. Martins and Marisa Dolhnikoff

J Appl Physiol 100:1610-1616, 2006. First published Jan 12, 2006; doi:10.1152/japplphysiol.00828.2005

You might find this additional information useful...

This article cites 36 articles, 22 of which you can access free at:

<http://jap.physiology.org/cgi/content/full/100/5/1610#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://jap.physiology.org/cgi/content/full/100/5/1610>

Additional material and information about *Journal of Applied Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/jappl>

This information is current as of June 26, 2006 .

Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips

Tatiana Lanças,¹ David I. Kasahara,² Carla M. Prado,² Iolanda F. L. C. Tibério,² Milton A. Martins,² and Marisa Dolhnikoff¹

Departments of ¹Pathology and ²Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Submitted 12 July 2005; accepted in final form 4 January 2006

Lanças, Tatiana, David I. Kasahara, Carla M. Prado, Iolanda F. L. C. Tibério, Milton A. Martins, and Marisa Dolhnikoff. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 100: 1610–1616, 2006. First published January 12, 2006; doi:10.1152/jappphysiol.00828.2005.—The peripheral lung parenchyma has been studied as a component of the asthmatic inflammatory response. During induced constriction, tissue resistance increases in different asthma models. Approximately 60% of the asthmatic patients show early and late responses. The late response is characterized by more severe airway obstruction. In the present study, we evaluated lung parenchymal strips mechanics in ovalbumin-sensitized guinea pigs, trying to reproduce both early and late inflammatory responses. Oscillatory mechanics of lung strips were performed in a control group (C), in an early response group (ER), and in two late response groups: 17 h (L1) and 72 h (L2) after the last ovalbumin challenge. Measurements of resistance and elastance were obtained before and after ovalbumin challenge in C and ER groups and before and after acetylcholine challenge in all groups. Using morphometry, we assessed the density of eosinophils and smooth muscle cells, as well as collagen and elastin content in lung strips. The baseline and postagonist values of resistance and elastance were increased in ER, L1, and L2 groups compared with C ($P \leq 0.001$). The morphometric analysis showed an increase in alveolar eosinophil density in ER and L2 groups compared with C ($P < 0.05$). There was a significant correlation between eosinophil density in parenchymal strips of C, L1, and L2 groups and values of resistance and elastance postacetylcholine ($r = 0.71$, $P = 0.001$ and $r = 0.74$, $P < 0.001$, respectively). The results show that the lung parenchyma is involved in the late response, and the constriction response in this phase is related to the eosinophilic inflammation.

distal lung inflammation; parenchymal oscillatory mechanics; asthma

THE DISTAL LUNG HAS BEEN SHOWN to play an important role in the pathophysiology of asthma. It has been suggested that small airway alterations may significantly contribute to the functional impairment in asthma, especially in the most severely affected patients (4, 9, 18). The peripheral lung parenchyma of asthmatic patients shows eosinophilic inflammation, as well as IL-5 overexpression (1, 11, 19). It has been shown that tissue resistance (R) increases during induced constriction in different animal models of asthma (7, 22, 31, 36). Although the heterogeneity of airway constriction may be responsible for the observed changes in tissue R in response to agonists (17), increases in tissue R may also reflect a direct role of parenchymal tissue in the overall lung response. Lung parenchymal strips submitted to sinusoidal oscillations in vitro can be used to determine the tissue mechanical behavior, as they represent

exclusively the distal units of lung tissue and offer a better assessment of pure tissue properties (6, 13).

Atopic subjects with asthma show bronchoconstriction that usually peaks within 2 h after allergen exposure (early asthmatic response). In ~60% of the subjects, bronchoconstriction also occurs from 3 to 7 h later, characterizing the late asthmatic response, which is associated with airway hyperresponsiveness and eosinophilic airway inflammation (37). This late response is clinically characterized by progressive, persistent, and more severe airway obstruction. In vivo experiments with alveolar capsules in rats have suggested that both airways and peripheral tissue are involved in the two phases of the inflammatory response (21). The involvement of the distal lung in the late asthmatic response could have therapeutic implications, because it has been demonstrated that most of the currently used inhaled steroids are predominantly deposited in the central airways and not in the lung periphery, which may result in the undertreatment of this lung compartment (32).

Hutson et al. (8) described a useful animal model in vivo to study the mechanisms involved in early and late bronchoconstriction responses. They found an early response at 2 h and two late responses at 17 and 72 h after challenge with ovalbumin (OVA) in previously sensitized guinea pigs. Although previous studies had shown that the peripheral lung parenchyma constrict during the early response after in vitro antigen challenge (22), the in vitro mechanical behavior of peripheral lung tissue during the different phases of the inflammatory response in a model of asthma had not been previously reported. In the present study, we evaluated the mechanical properties of lung parenchymal strips in OVA-sensitized guinea pigs, trying to reproduce both early and late inflammatory responses. We also correlated the functional behavior of lung strips with morphometric parameters of eosinophilic inflammation, contractile cell content, and extracellular matrix (ECM) structure.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the review board for human and animal studies of the School of Medicine of the University of São Paulo. All animals in the study received humane care in compliance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication 85-23, revised 1985).

Experimental groups and antigen sensitization. Twenty-four male Hartley guinea pigs weighing 300–400 g were used in the experimental protocol. The animals were divided in four groups: an early response group (ER, $n = 6$); two late response groups (L1, $n = 5$, killed 17 h after the last challenge, and L2, $n = 6$, killed 72 h after the

Address for reprint requests and other correspondence: M. Dolhnikoff, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 Sala 2118, 01246-903, São Paulo, SP, Brazil (e-mail: maridol@usp.br).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

last challenge), and a control group (C, $n = 7$). For antigen sensitization, animals were placed in an acrylic box ($30 \times 15 \times 20$ cm) coupled to an ultrasonic nebulizer (Soniclear, São Paulo, Brazil). A solution of OVA (Advanced Nutrition) diluted in 0.9% NaCl (normal saline) was prepared. This solution was continuously aerosolized into the environment until respiratory distress (sneezing, coryza, cough, or retraction of the thoracic wall) occurred, or until 15 min had elapsed. The observer who made the decision to withdraw the guinea pig from the inhalation box was blinded as to the treatment status of the animal. This protocol was repeated twice a week for 4 wk (10, 30) with increasing concentrations of OVA to avoid tolerance. The early response group was exposed to a total of seven inhalations with aerosolized OVA with increasing concentrations from 1 to 5 mg/ml. An eighth challenge with 0.1% OVA was performed directly on lung strips in the organ bath. This optimal dose was determined by preliminary experiments using different OVA doses (0.003–0.3% OVA). The two late response groups (L1 and L2) were exposed to eight inhalations with increasing concentrations from 1 to 10 mg/ml. The control group was submitted to inhalation of aerosolized normal saline.

Oscillatory mechanics evaluation. After sensitization, the guinea pigs were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip), tracheostomized, and, after thoracotomy, exsanguinated. The heart and lungs were excised en bloc, and the lungs were infused with Krebs solution (in mM: NaCl, 118; KCl, 4.5; NaHCO_3 , 25.5; CaCl_2 , 2.5; MgSO_4 , 1.2; KH_2PO_4 , 1.2; glucose 10; Sigma Chemical, St. Louis, MO). Sagittal slices of both lungs (here defined as total lung) were fixed in 10% formalin for 48 h, embedded in paraffin, and routinely processed. Subpleural parenchymal strips of the lower lobes ($10 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) were cut, and the resting length (L_r) and wet weight (W_0) of each strip were measured. Metal clips were glued to either end of the tissue strip with cyanoacrylate. Steel wires (0.5-mm diameter) were attached to the clips; one end was connected to a force transducer (model 404A; Cambridge Technologies) and the other end was connected to a servo-controlled lever arm (model 300B; Cambridge Technologies). The lever arm was capable of peak-to-peak length excursions of 8 mm and length resolutions of $1 \mu\text{m}$ and was in turn connected to a function generator (model 3030; BK Precision, Chicago, IL), which controlled the frequency, amplitude, and waveform of the oscillation. The resting tension (T) was set by movement of a screw thumb wheel system, which effected slow vertical displacements of the force transducer. Length and force signals were converted from analog to digital with an analog-to-digital converter and recorded in a compatible computer. The strips were preconditioned by slowly cycling tension from 0 to 2 g three times and, after the third cycle, they were fixed at 1 g and maintained in the organ bath containing Krebs solution aerated with 95% of O_2 and 5% of CO_2 for 50 min to allow stress relaxation, during which Krebs solution was changed every 15 min. The frequency of oscillation was 1 Hz and the amplitude was 2.5% L_r . After these 50 min, the final resting tension was ~ 0.8 g.

In the control and early groups, the strips were challenged with OVA (0.1%) in the bath to obtain a maximal response (22). After 10 min, Krebs solution was changed before addition of acetylcholine 10^{-3} M (ACh) (Sigma Chemical, St. Louis, MO) to the bath. In the two late response groups, only ACh was added to the bath. Measurements of R and elastance (E) were obtained at baseline for 5 min, after OVA challenge in the ER and C groups, and after addition of ACh to the bath in all groups.

R and E were estimated by the recursive least-squares algorithm to the equation of motion (12):

$$T = E\Delta l + R(\Delta l/\Delta t) + K \quad (1)$$

where T is tension, l is length, $\Delta l/\Delta t$ is the length change per unit time, and K is a constant reflecting resting tension. Results were standardized for strip size. The unstressed cross-sectional area (A_0) of the strip was obtained from the formula:

$$A_0(\text{cm}^2) = W_0/(\rho \times L_r) \quad (2)$$

where ρ is the mass density of the tissue taken as 1.06 g/cm^3 , W_0 is the wet weight in grams, and L_r is the resting length in centimeters. Values of R and E were multiplied by L_r/A_0 . After the mechanical oscillation, the strips were fixed in 10% formalin for 48 h and embedded in paraffin for histological analysis.

Morphometric studies. Five-micrometer-thick slides of both lung strips and total lung were stained with hematoxylin and eosin for routine histological analysis and with Luna staining for eosinophils (15, 34). Lung strips were also submitted to immunohistochemistry with anti-smooth muscle actin and stained with Sirius Red for collagen and Resorcin-Fuchsin staining for elastic fibers (3). For the immunohistochemistry analysis, sections were deparaffinized and a 0.5% peroxidase in methanol solution was applied for 10 min to inhibit endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was performed with citrate solution for 30 min. Sections were incubated with anti-human smooth muscle actin, 1A 4, Dako, Denmark, overnight at 4°C . A LSAB Plus-HRP kit (K-0690 DAKO, Carpinteria, CA) was used as secondary antibody, and 3,3 diaminobenzidine (Sigma Chemical) was used as chromogen. The sections were counterstained with Harris hematoxylin.

By conventional morphometry, we assessed the density of eosinophils in airway walls of total lungs and within alveolar septa of lung strips. Using a 100-point grid with a known area ($62,500 \mu\text{m}^2$ at a $\times 400$ magnification) attached to the microscope ocular, we counted the number of points hitting the outer area of the airway wall (located between the external limit of smooth muscle layer and the adventitia). The airway area in each field was calculated according to the number of points hitting the airway, as a proportion of the total grid area. We then counted the number of eosinophils within that airway wall area. In the lung strips, we counted the number of points hitting alveolar tissue in each field and the number of eosinophils within the alveolar septa. Eosinophil density was determined as the number of eosinophils in each field divided by tissue area. Measurements are expressed as cells per square micrometer. The results were then transformed to cells per square millimeter by adjusting the units (1). Counting was performed in 15 fields of airway walls and 10 fields of lung strip for each animal at a $\times 400$ magnification.

The volume proportion of actin-positive cells in the lung strips was determined by dividing the number of points hitting actin-positive cells by the total number of points hitting the tissue. The volume proportion of collagen and elastic fibers in the alveolar tissue of lung strips was determined by dividing the number of points hitting collagen or elastin by the total number of points hitting alveolar septa. Measurements were performed in 10 fields of lung strip for each animal at a $\times 400$ magnification. Results were expressed as a percentage.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using SPSS 10.0 computer package. Student's t -test was used to compare functional parameters before and after agonist challenge. We used one-way ANOVA and Tukey's post hoc test for comparison of the different parameters among groups. Values are expressed as means $\pm$ SE. Pearson correlation was used for correlations between morphometric and functional parameters. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Oscillatory mechanics. Figures 1 and 2 show, respectively, values of R and E (basal and after agonist challenge) in the four groups. We observed an increase in baseline R and E in the three sensitized groups compared with control ($P < 0.001$). After adding agonists to the bath (OVA in the C and ER groups, and ACh in all groups), there was significant increase in R and E values compared with control group ($P \leq 0.001$).

Fig. 1. Means $\pm$ SE of resistance values in parenchymal strips from ovalbumin (OVA)-sensitized and control animals at baseline (Rbas), after OVA challenge (Rova) in control and early response (Early) groups, and after adding ACh 10^{-3} (Rach) in all groups. Late1 and Late2, responses measured 17 and 72 h, respectively, after the last OVA challenge. $*P \leq 0.001$ compared with sensitized groups; $\S P < 0.01$ compared with baseline values.

There was also a significant increase in both R and E after agonist challenge when compared with baseline values in all groups ($P < 0.01$). No significant difference in R and E percent increase was observed after agonist challenge among the four groups.

Morphometric analysis. Figures 3 and 4 show, respectively, the eosinophil density in airways and parenchymal strips in the four experimental groups. We observed a significant increase in airway eosinophil density in the three sensitized groups compared with control group ($P < 0.001$). The lung strips showed a significant increase in alveolar eosinophil density in the ER and L2 groups compared with controls ($P < 0.05$).

Fig. 2. Means $\pm$ SE of elastance values in parenchymal strips from OVA-sensitized and control animals at baseline (Ebas), after OVA challenge (Eova) in control and early groups, and after adding ACh 10^{-3} (Each) in all groups. $*P < 0.001$ compared with sensitized groups; $\S P < 0.01$ compared with baseline values of each group.

Fig. 3. Means $\pm$ SE of airways eosinophil density in OVA-sensitized and control animals. Results are expressed as cells/mm². $*P < 0.001$ compared with control group.

Figure 5 shows the volume proportion of alveolar collagen in lung strips in control and OVA-sensitized animals. There was a significant increase in collagen content after sensitization ($P = 0.016$). Figure 6 shows representative photomicrographs of alveolar eosinophilic infiltration and collagen density in controls and sensitized animals. There was no significant difference in actin and elastic fiber content in lung strips between control and sensitized animals.

Correlations between morphometric and functional parameters were performed separately for early and late response groups. Table 1 shows the correlation coefficients in ER and C strips, considering the response to OVA and ACh challenge in the bath. We observed significant correlations between the strip actin content and baseline R and E, post-OVA R and E, post-ACh R and E, and post-OVA R percent increase. There was a significant correlation between the percent increase in

Fig. 4. Means $\pm$ SE of alveolar eosinophil density in parenchymal strips from OVA-sensitized and control animals. Results are expressed as cells/mm². $*P < 0.05$ compared with control group.

Fig. 5. Means $\pm$ SE of lung parenchymal strips collagen content in OVA-sensitized and control animals. Results are expressed as percentage. $*P = 0.016$ compared with control group.

post-OVA R and the strip eosinophil density. We also observed significant correlations between the strip elastic content and baseline and post-ACh R and baseline, post-OVA, and post-ACh E. There were no significant correlations between collagen content and functional parameters in ER group. Table 2 shows the correlation coefficients in L1, L2, and C strips, considering the response to ACh challenge in the bath. There were significant correlations between eosinophil density and baseline R and E, and post-ACh R and E, indicating that the late response in this asthma model is related to eosinophilic infiltration. We also observed significant correlations between the strip collagen content and baseline R and E and post-ACh

R and E. There were no significant correlations between actin and elastic content and functional parameters in L1 and L2 groups.

DISCUSSION

The present study evaluated the role of peripheral lung parenchyma in the late inflammatory response in an experimental model of asthma. The results show that, in this guinea pig model of chronic allergic inflammation, the lung mechanical and inflammatory responses were present up to 72 h after antigen challenge. The peripheral lung parenchyma was involved not only in the early but also in the late inflammatory response, characterized by the baseline increase of tissue R and E in L1 and L2 groups compared with controls. We also showed that both early and late inflammatory responses presented an eosinophilic infiltration, which was strongly correlated to the late mechanical parenchymal changes. We further demonstrated that this late inflammatory response model is characterized by remodeling of the lung distal units with collagen content increase in sensitized animals.

It has been demonstrated that the airway allergic response can show a late phase that, in most cases, is clinically more severe and more difficult to treat than the early response (23). This late response occurs in ~50% of asthmatic adults (24) and in 70–85% of children with asthma (33).

Although the early response seems to be highly dependent on mediators released by mast cells, mainly represented by leukotrienes and histamine, leading to airway bronchoconstriction and edema, the development of the late phase is associated with the influx and activation of other inflammatory cells in the bronchial mucosa, mainly lymphocytes and eosinophils (25, 26).

The role of peripheral lung tissue in asthma pathophysiology has been intensively studied in the last years. Human studies

Fig. 6. Photomicrographs of lung parenchymal strip eosinophilic infiltration (A and B) and collagen density (C and D) in controls (right) and sensitized (left) animals. Sensitized animals showed a significant increase in alveolar eosinophilic infiltration and collagen density when compared with controls. Scale bar = 100 μ m.

Table 1. *Correlation matrix between functional and morphometric parameters in parenchymal strips of Control and Early groups (R values)*

MP	Rbas	Rova	%Rova	Rach	%Rach	Ebas	Eova	%Eova	Each	%Each
Eosinophil	0.29 (NS)	0.34 (NS)	0.58 (0.03)	0.24 (NS)	0.10 (NS)	0.30 (NS)	0.32 (NS)	0.47 (NS)	0.30 (NS)	0.11 (NS)
Actin	0.60 (0.02)	0.65 (0.01)	0.61 (0.02)	0.67 (0.01)	0.26 (NS)	0.63 (0.02)	0.66 (0.01)	0.55 (NS)	0.66 (0.01)	0.21 (NS)
Elastin	0.54 (0.05)	0.51 (NS)	0.30 (NS)	0.56 (0.04)	0.20 (NS)	0.58 (0.03)	0.56 (0.04)	0.29 (NS)	0.56 (0.04)	0.02 (NS)

MP, morphometric parameter; Rbas, baseline resistance; Rova, resistance after ovalbumin (OVA) challenge; %Rova, percent increase of resistance after OVA challenge; Rach, resistance after ACh challenge; %Rach, percent increase of resistance after ACh challenge; Ebas, baseline elastance; Eova, elastance after OVA challenge; %Eova, percent increase in elastance after OVA challenge; Each, elastance after ACh challenge; %Each, percent increase of elastance after ACh challenge. *P* values are shown in parentheses; NS, nonsignificant.

show eosinophilic and lymphocytic inflammation and interleukin overexpression in the peripheral lung of asthmatic patients (1, 11, 19). Experimental models and human studies have shown that the distal lung units can respond to agonists with increase in tissue resistance (2, 5). The role of the peripheral parenchyma in the overall lung response to agonists is controversial. It has been demonstrated that changes in tissue resistance after induced constriction are a consequence of the airway inhomogeneities (16, 17). Conversely, other studies show that, even in inhomogeneous lungs, the bronchoconstrictive responses to agonists and inflammation are predominantly located in the lung periphery (31). Nagase et al. (21) evaluated the *in vivo* lung tissue properties in the early and late responses in OVA-sensitized rats with the use of alveolar capsules, suggesting that both airways and peripheral tissue are involved in the two phases of the allergic response. The same authors showed that, after *in vitro* challenge, the peripheral lung parenchyma contracts during the early phase (22). No studies have evaluated the *in vitro* pulmonary tissue behavior at the late asthmatic response. Our results agree with those of Nagase et al. and show that the parenchymal contractile response occurs not only at the early but also at the late phase. Moreover, because there was no difference in the percent increase of *R* and *E* after agonist challenge among the groups, we can conclude that the degree of peripheral contractile response is similar in both early and late phases.

In addition to the increase in airway eosinophils in the sensitized groups, we also observed a significant increase in eosinophil density in the peripheral tissue of the ER and L2 groups compared with the C group. This result is similar to human studies that show that lung inflammation in asthma is also present at the alveolar parenchyma level (1, 11, 35). We have recently demonstrated, in humans, that the eosinophilic inflammation is widely distributed within the respiratory tract in fatal asthmatic patients, from the nasal mucosa to the distal lung (1). The observation of peripheral lung inflammation in asthmatic subjects points toward a therapeutic issue, because most of the currently used inhaled steroids are predominantly deposited in the central airways and not in the lung periphery, which may result in undertreatment of this lung compartment

(29). Subjects who develop the late phase of the inflammatory response are usually those who have more severe asthma and therefore require more intensive therapeutic care. In the present study, we demonstrated that there is a contractile response of peripheral lung parenchyma also in this late phase. However, the extent to which our results can be transposed to human asthma is unclear.

In the present study, we observed an eosinophilic infiltration in all sensitized groups (ER, L1, and L2). The positive correlation between *R* and *E* values and tissue eosinophil density suggests that the late response and, to a lesser degree, the early response, is at least in part dependent on the eosinophilic inflammation. The mechanisms involved in the tissue behavior in the presence of eosinophilic inflammation have not been fully understood and can involve the response of contractile cells in small airways, alveolar ducts, and alveoli (myofibroblasts) (14). We have previously demonstrated that the peripheral lung tissue response to acetylcholine in humans is not dependent on the presence of airways in the tissue, pointing to a predominant response of alveolar ducts and lung parenchyma (2). Eosinophilic mediators such as LTC₄ (20) and PAF (27) can induce bronchoconstriction. These mediators might also be involved in the alveolar response. It is noteworthy in our study that the tissue response with increase in *R* and *E* had a strong correlation with the actin content in the early phase and with the degree of eosinophilic inflammation in the late phase. These results suggest that the early response is more dependent on the presence of contractile cells in the tissue and can be related to acute phase mediators released by other inflammatory cells, such as mast cells, whereas the late phase seems to be dependent on mediators related to eosinophils. The analysis of the inflammatory mediators involved in the two phases of the peripheral parenchyma response to agonists would contribute to a better knowledge of its pathophysiology.

The ECM components determine, to a large extent, the mechanical behavior of lung tissue. Collagen is the most abundant macromolecule of the lung ECM and the most critical for structural integrity. Both collagen and elastin are important in determining lung elastic properties (28). It has been suggested that airway remodeling can be responsible for the

Table 2. *Correlation matrix between functional and morphometric parameters in parenchymal strips of Control, Late 1, and Late 2 groups (R values)*

MP	Rbas	Rach	%Rach	Ebas	Each	%Each
Eosinophils	0.72 (0.001)	0.71 (0.001)	0.30 (NS)	0.75 (<0.001)	0.74 (<0.001)	0.19 (NS)
Collagen	0.82 (<0.001)	0.79 (<0.001)	0.12 (NS)	0.84 (<0.001)	0.83 (<0.001)	0.11 (NS)

P values are shown in parentheses.

persistent obstruction and the pulmonary function decline observed in some asthmatic patients. The small airway remodeling can significantly contribute to the lung function loss in these patients, mainly in those with severe asthma (9, 18). In the present study, we observed peripheral lung tissue remodeling characterized by the significant increase in collagen content in the lung strips of sensitized animals, probably secondary to the chronic inflammation. The collagen content was positively correlated with baseline and post-ACh R and E values in the late-phase groups. Although there was no difference regarding elastic fiber content among the groups, we also observed a correlation between the elastic fiber content and baseline R and baseline and post-ACh R and baseline and post-OVA E values in C and ER groups. Xisto et al. (36) recently demonstrated, in a chronic asthma model in mouse, evidence of lung remodeling not only of the airways but also of the peripheral lung parenchyma, characterized by increase in collagen and actin content in distal lung tissue. We recently described in humans elastic fiber changes in alveolar attachments of distal airways in fatal asthma patients. These peripheral extracellular matrix alterations can be at least in part responsible for the functional alterations observed in these patients, such as loss of deep breath bronchodilator effect in bronchoconstrictive episodes and enhanced airway closure (18). Although the increase in collagen content in the lung periphery has not been described in humans to date, our results reinforce the importance of peripheral lung alterations in asthma, pointing to the remodeling of distal lung units.

In conclusion, we have shown that the peripheral lung parenchyma is involved in the late phase of the inflammatory response in this guinea pig model of chronic allergic inflammation. Lung tissue R and E are increased in the late phase of the response when compared with controls and have similar intensities when compared with the early phase. The degree of antigen-specific response in the early phase is related to the contractile cell content in lung parenchyma. Both early and late inflammatory responses are characterized by eosinophilic inflammation, which seems to be strongly related to the lung tissue response during the late phase. The mechanical behavior of lung tissue in the late phase is also related to the extracellular matrix remodeling, particularly to tissue collagen content.

GRANTS

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Laboratórios de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERENCES

- De Magalhaes Simoes S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Ferneztian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, de Arruda Martins M, Saldiva PH, Mauad T, and Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 35: 602–611, 2005.
- Dolhnikoff M, Morin J, and Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1607–1612, 1998.
- Dolhnikoff M, Mauad T, and Ludwig MS. Extracellular matrix and oscillatory mechanics of rat lung parenchyma in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1750–1757, 1999.
- Enfumsa Study Group. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 22: 470–477, 2003.
- Fredberg JJ, Bunk D, Ingenito E, and Shore SA. Tissue resistance and the contractile state of lung parenchyma. *J Appl Physiol* 74: 1387–1397, 1993.
- Fust A, Bates JH, and Ludwig MS. Mechanical properties of mouse distal lung: in vivo versus in vitro comparison. *Respir Physiol Neurobiol* 143: 77–86, 2004.
- Homma T, Bates JH, and Irvin CG. Airway hyperresponsiveness induced by cationic proteins in vivo: site of action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L413–L418, 2005.
- Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P, and Holgate ST. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 137: 548–557, 1988.
- In't Veen JC, Beekman AJ, Bel EH, and Sterk PJ. Recurrent exacerbations in severe asthma are associated with enhanced airway closure during stable episodes. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1902–1906, 2000.
- Kips JC, Cuvelier CA, and Powells RA. Effect of acute and chronic inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis* 145: 1306–1310, 1992.
- Kraft M, Djukanovic S, Wilson S, Holgate ST, and Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1505–1510, 1996.
- Lauzon AM and Bates HT. Estimation of time-varying respiratory mechanical parameters by recursive least squares. *J Appl Physiol* 71: 1159–1165, 1991.
- Leite-Junior JH, Rocco PR, Faffe DS, Romero PV, and Zin WA. On the preparation of lung strip for tissue mechanics measurement. *Respir Physiol Neurobiol* 134: 255–262, 2003.
- Ludwig MS and Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation. *J Appl Physiol* 77: 2029–2035, 1994.
- Luna LG. *AFIP Manual of Histologic Staining Methods*. New York: McGraw-Hill, 1986.
- Lutchen KR, Greenstein JL, and Suki B. How inhomogeneities and airway walls affect frequency dependence and separation of airway and tissue properties. *J Appl Physiol* 80: 1696–1707, 1996.
- Lutchen KR, Hantos Z, Petak F, Adamicza A, and Suki B. Airway inhomogeneities contribute to apparent lung tissue mechanics during constriction. *J Appl Physiol* 80: 1841–1849, 1996.
- Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, Saldiva PH, and Dolhnikoff M. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 857–862, 2004.
- Minshall EM, Hogg JC, and Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 101: 386–390, 1998.
- Moloney ED, Griffin S, Burke CM, Poulter LW, and O'Sullivan S. Release of inflammatory mediators from eosinophils following a hyperosmolar stimulus. *Respir Med* 97: 928–932, 2003.
- Nagase T, Moretto A, Dallaire MJ, Eidelman DH, Martin JG, and Ludwig MS. Airway and tissue responses to antigen challenge in sensitized brown Norway rats. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 218–226, 1994.
- Nagase T, Fukuchi Y, Dallaire MJ, Martin JG, and Ludwig MS. In vitro airway and tissue responses to antigen in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 81–86, 1995.
- O'Byrne P. Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *J Allergy Clin Immunol* 102: S85–S89, 1998.
- Robertson DG, Kerigan AT, Hargreave FE, and Dolovich J. Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 54: 244–254, 1974.
- Robinson DS, Bentley AM, Hartnell A, Kay AB, and Durham SR. Activated memory T helper cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with atopic asthma: relation to asthma symptoms, lung function, and bronchial responsiveness. *Thorax* 48: 26–32, 1993.
- Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, and Durham SR. Activation of CD4+ T cell, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92: 313–324, 1993.
- Sugiura T, Mabuchi K, Ojima-Uchiyama A, Masuzawa Y, Cheng NN, Fukuda T, Makino S, and Waku K. Synthesis and action of PAF in human eosinophils. *J Lipid Mediators* 5: 151–153, 1992.

28. Suki B, Ito S, Stamenovic D, Lutchen KR, and Ingenito EP. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. *J Appl Physiol* 98: 1892–1899, 2005.
29. Sutherland ER and Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89: 119–124, 2002.
30. Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, and Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1739–1747, 1997.
31. Tomioka S, Bates JH, and Irvin CG. Airway and tissue mechanics in a murine model of asthma: alveolar capsule vs. forced oscillations. *J Appl Physiol* 93: 263–270, 2002.
32. Tulic MK and Hamid Q. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target. Roger S. Mitchell lecture. *Chest* 123, Suppl 3: 348S–355S, 2003.
33. Van Lookeren Campagne M, Knol K, and De Vries K. House dust provocation in children. *Scand J Respir Dis* 50: 76–85, 1969.
34. Watanabe T, Okano M, Hattori H, Yoshino T, Ohno N, Ohta N, Sugata Y, Orita Y, Takai T, and Nishizaki K. Roles of FcγRIIB in nasal eosinophilia and IgE production in murine allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 105–112, 2004.
35. Wenzel SE, Szeffer SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, and Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 737–743, 1997.
36. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanco MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnieli D, Silva LF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, and Rocco PR. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 829–837, 2005.
37. Yoshida M, Watson R, Rerecich T, and O'Byrne PM. Different profiles of T-cell IFN-gamma and IL-12 in allergen-induced early and dual responders with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 115: 1004–1009, 2005.