

DAVID ITIRO KASAHARA

**β_2 -agonista como imunomodulador da resposta inflamatória
pulmonar crônica induzida em camundongos sensibilizados
com ovoalbumina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof^ª Dr^ª Maria do Patrocínio T. Nunes

SÃO PAULO

2004

“Todo aquele que busca a verdade nas ciências da natureza, chega à conclusão de que existe uma Força Superior que se manifesta nas leis dos Cosmos”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao meu Senhor, grande Deus, que deu-me saúde e força para concluir mais uma etapa em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Kazunori e a Kimiko Kasahara. Sem o apoio deles, não poderia ter realizado esse projeto de vida. Além disso, não posso me esquecer de agradecer à minha irmã, toda caridosa, mesmo em momentos que não pude estar ao lado dela para consolar os seus momentos de doença.

Agradeço à minha Orientadora, a Profa. Patrô (Maria do Patrocínio Tenório Nunes) que aceitou me orientar nesta etapa da minha vida, não somente com a minha tese de Doutorado, mas na tese da Vida, onde amadureci muito nesses quase quatro anos que durou esse trabalho. À minha querida Patrô, que Deus ilumine a sua vida e aqueles que você salva como uma Médica competente, como Professora que forma novos médicos e novos líderes, como Mulher que cuida da família, e como uma Líder na Faculdade de Medicina, que resolve todos os problemas da Casa de Arnaldo, principalmente no que tange à Residência Médica.

A um grande amigo, que admiro cada vez mais, o Prof. Milton, cujo caráter e o espírito nobre o torna um grande vencedor. Há uma lenda que fala de um herói que conseguiu desatar o nó Górdico com a sua espada e tornou-se o maior líder da História. O Professor conseguiu desatar esse nó há tempos, não com a força bruta,

mas com a temperança e o senso de Justiça que o acompanham. Aprendi o que é ser professor, líder, fazer justiça, ter tolerância e outras virtudes no convívio com esse formidável Mestre.

Agradeço às minhas companheiras de empreitada, as Fês: *Fernanda Arantes* e a *Fernanda Lopes*, que ouviram muitas lamentações e frases de desespero da minha pessoa. Elas deram a mim, impulsos para que conseguisse finalizar esse trabalho. Além disso, não posso esquecer a preciosa ajuda que tive delas na mensuração dos parâmetros de mecânica pulmonar. Grandes amigas e companheiras de trabalho.

Minha eterna gratidão à *Bia* (Beatriz) que participou deste trabalho, além de sempre oferecer-me ajuda e conselhos preciosos.

Ao Silmar, aquele que começou essa empreitada comigo, sendo o meu companheiro dos primeiros pilotos desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Pepino (Paulo Saldiva), que com o seu grande senso de humor e a sua espetacular inteligência, lidera o maior e o melhor laboratório de estudo de poluentes do nosso amado Brasil. Deus lhe dê muito mais sucesso do que tem conseguido até agora.

Agradeço à Dra. Edna Leick_Maldonado pela amizade que criamos desde a minha estada pelo laboratório, e pela revisão de parte do texto do trabalho.

Agradeço a Dra. Iolanda, a Dra. Edna e a Carla (minha companheira de Doutorado) pela oportunidade de aprender e trabalharmos juntos nos projetos de inflamação pulmonar. Muitas coisas que sei sobre asma e protocolos experimentais se devem a elas.

À Dra. Marisa Dolhnikoff que deu me a oportunidade de aprender a técnica de micromecânica de tecidos, e a participar dos projetos relacionados a essa técnica. Além disso, a Dra. Marisa, junto à Dra. Thais Mauad, me ajudaram quando ainda não sabia como quantificar as inflamações pela morfometria. Sinto-me honrado em trabalhar com essas duas pessoas, exemplo de pesquisadoras e modelos de docente.

A todos do laboratório: Dra. Adenir, Dra. Lúcia, Dra. Luciana, Dr. Joaquim, Dr. Celso, Dra. Adriana, Alessandra, Tatis (Tatiana Lanças e Tatiana Pinto), Francine, Sílvia, Déborah, Flavinha, Viviane Ruiz, Adriane, Hémerison, Ana Cecília, e a todos aqueles que não citei aqui, mas que estiveram dando votos de apoio ao meu trabalho.

À Rosana, à Sirlene e à Vilma, sempre ajudando-nos, mesmo nos momentos mais tumultuados de suas vidas, sempre protegendo os nossos projetos de pesquisa.

A todos amigos do LIM-05: Dolores, Sandra, Regiane, Heloísa, Ana Júlia, Débora-Jã, Tigre, Fernando e Alexandre.

Àqueles que trabalharam na retaguarda, mantendo o nosso biotério limpo, cuidando de meus camundongos, para dar-lhes conforto e saúde: agradecimento em

especial ao meu amigo David e ao Carlos. Agradeço à Dona Severina, sempre mantendo o nosso laboratório apresentável. Lembro-me de uma Conferência proferida pelo Prof. Luiz Barco, que afirmou: *sem o trabalho da faxineira, o cirurgião nada é*. Portanto, tomo as palavras dele e digo: Sem os “Davis” e as “Severinas”, de nada adiantaria termos as brilhantes idéias e os recursos para trabalharmos.

Aos meus amigos, conhecidos como os Cavaleiros do Apocalipse, Professores Giovane Favero, Ricardo Monezzi e Humberto Dellê. Além disso, ao nosso amigo Roberto Gallo. Lembro-me como hoje dos nossos almoços regados à filosofia científica no COSEAS, e do primeiro churrasco da Fisiopato na casa do Gallo. Infelizmente o despotismo de alguns, tornou os nossos encontros de almoço praticamente impraticáveis. Deixo aqui a minha crítica à USP: *Onde está o ambiente acadêmico que tanto se fala pelos corredores da Universidade?*

Agradeço ao Prof. Roger Chamas, um grande professor e aquele que tem lutado muito pelo nosso Programa de Pós-Graduação Sensu Estrito em Ciências: Fisiopatologia Experimental. Ele herdou do Prof. Gregório a árdua missão de conduzir a Fisiopato para um verdadeiro espírito de Universidade e de Academia.

Agradeço ao Prof. Gregório Santiago Montes (*in memoriam*) pela sua dedicação ao programa de Fisiopatologia Experimental. Lembro-me do dia em que fui procurá-lo com o intuito de cursar o Mestrado. Ele me conduziu à pessoa que seria a minha “*futura*” orientadora de Mestrado e Doutorado.

Agradeço aos meus amigos Dr. Leonardo Jorgetto, Eng. Fábio Massoni, à Priscila Monteiro e ao Eng. Alexandre Ching.

Existe uma pessoa especial que agradeço. Ela é a Profa. Maria Aparecida Basile, coordenadora do Programa de Aperfeiçoamento em Ensino (PAE) da Casa de Arnaldo. Ela foi uma pessoa a qual abriu uma porta que proporcionou uma visão mais ampla do mundo acadêmico que nos rodeia, em especial às disciplinas de didática, em que tive a honra de ser convidado a participar como aluno-monitor.

Agradeço a **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de doutorado de demanda social, por intermédio do Programa de Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Agradeço também a paciência das secretárias do Programa, em especial a Sonia e a Tânia.

Agradeço aos pobres camundongos que, infelizmente, tornaram-se aqueles seres que, de seus corpos e da sua passiva participação científica, permitirão à humanidade conhecer os obscuros caminhos dos mistérios que nos cercam. A Ciência é a centelha que acende um fósforo dentro do escuro Universo ao qual tentamos enxergar uma pequeníssima parte.

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1. Asma	1
1.2. Fisiopatologia da asma	4
1.3. Asma e a hiper-reatividade	13
1.4. Modelos experimentais de asma	19
1.5. Asma e tratamento	23
1.6. Broncodilatadores agonistas de receptor β_2 -adrenérgico	27

2. Objetivos	35
--------------------	----

3. Material	36
-------------------	----

4. Métodos

4.1. Animais	39
4.2. Sensibilização e indução da inflamação pulmonar	40
4.3. Tratamento com salbutamol	41
4.4. Controles	41
4.5. Preparação do animal	42
4.6. Lavado broncoalveolar	42
4.7. Coleta de pulmões e histopatologia	43
4.8. Citoquímica para eosinófilos EPO+	45
4.9. Anafilaxia cutânea passiva	46
4.10. Análise estatística	48

5. Resultados

5.1. Definição do modelo a ser utilizado	49
5.2. Lavado broncoalveolar	51
5.3. Estudo histopatológico	59
5.4. Citoquímica para eosinófilos EPO+	63
5.5. PCA para IgE específica a OVA	69

6. Discussão	71
--------------------	----

7. Conclusões	85
---------------------	----

8. Referências Bibliográficas	86
-------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
Al(OH) ₃	Hidróxido de Alumínio
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	Adenil Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
	Proteína Ativadora
AP	
ATP	Adenosina Trifosfato
BAL	Lavado Broncoalveolar
BALF	Fluído do Lavado Broncoalveolar
BALT	Tecido Linfocitário Brônquico
CCR	Receptor de quimiocina
CD	Cluster of Differentiation
COMT	Catecol-orto-metiltransferase
ECP	Proteína Catiônica Eosinofílica
EPO	Peroxidase Eosinofílica
EPX/EDN	Proteína X Eosinofílica/Neurotoxina Derivada de Eosinófilos
FcεRI	Receptor tipo I para Região Constante da Imunoglobulina E
FOT	Técnica de Oscilação Forçada
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia Granulócito-Macrófago
GR	Receptor de Glicocorticóide
GRK	Quinase de Receptor Acoplado a Proteína G
ICAM	Molécula de Adesão Celular
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LMN	Células Linfomononucleares
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
MAO	Monoamino Oxidase
MBP	Proteína Básica Principal

MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NB- κ B	Fator Nuclear κ B
NIH	National Institute of Health – Instituto Nacional de Saúde
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCA	Anafilaxia Cutânea Passiva
PGD2	Prostaglandina D2
PKA	Proteína Quinase A
PLA2	Fosfolipase A2
RANTES	Regulado sob ativação, expresso e secretado pelos linfócitos T
STAT2	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 2
TCR	Receptor de Célula T
Th2	T helper tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UI	Unidade Internacional

Kasahara DI. β_2 -agonista como imunomodulador da resposta inflamatória pulmonar crônica induzida em camundongos sensibilizados com ovoalbumina [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 103p.

Estudamos o efeito do tratamento com salbutamol em dois regimes: diário (DS) e administrado a intervalos de 96 horas (IS) em camundongos balb/c sensibilizados com injeções intraperitoneais de uma solução de ovoalbumina (OVA) adsorvida em hidróxido de alumínio, e desafiada com inalações de ovoalbumina a 1%. O grupo controle SAL recebeu injeções i.p. de salina e desafios inalatórios de salina. A partir do 34^o dia, os animais OVA foram tratados com salbutamol via inalatória 10 mg/ml durante 15 minutos nos dois regimes descritos. Os animais foram sacrificados no 60^o dia, que corresponde a 48 horas após o último desafio antigênico. Após os camundongos serem anestesiados com pentobarbital sódico via i.p., eles foram traqueostomizados e entubados e sacrificados com secção da Aorta abdominal. Então, procedeu-se com a coleta do lavado broncoalveolar para a quantificação de leucócitos. Coletamos os tecidos pulmonares para a avaliação do processo inflamatório por quantificação de células linfomononucleares (LMN) e eosinófilos EPO+, essa última com marcação citoquímica. Além disso, estudamos a influência do tratamento adrenérgico sobre o IgE anafilático. O modelo de inflamação (grupo OVA) produziu significativo aumento do número de células totais, de eosinófilos e de neutrófilos observados na avaliação de lavado broncoalveolar. Além disso, houve nesse grupo processo inflamatório na parede de vias aéreas, caracterizada por um infiltrado linfomononuclear e com presença de eosinófilos. O nosso processo de indução de inflamação também recrutou eosinófilos para o septo alveolar. O tratamento com salbutamol diário produziu uma queda significativa do processo inflamatório no BAL, principalmente de neutrófilos e eosinófilos, enquanto que o tratamento intermitente produziu redução significativa apenas de neutrófilos. O tratamento com salbutamol a cada 96 horas (IS) promoveu uma queda significativa de células LMN quantificadas no septo alveolar, mas não atingindo valores do grupo salina (NS). Ambos os tratamentos com salbutamol produziu redução significativa de células EPO+ no parênquima pulmonar ($P < 0,05$). Apesar das alterações no processo celular, o salbutamol não influenciou na expressão de anticorpos IgE anafiláticos a OVA. Assim, podemos concluir que o salbutamol apresenta atividade imunomoduladora, observada por redução de eosinófilos no BAL e no parênquima pulmonar, apesar de não atingir valores semelhantes aos animais do grupo salina.

Descritores: albuterol, ovoalbumina, camundongos balb/c, inflamação, líquido de lavagem broncoalveolar e eosinofilia pulmonar

Kasahara DI. β_2 -agonist as immunomodulator of chronic lung inflammatory response induced in mice sensitized with ovalbumin [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 102p.

We studied the effects of salbutamol treatment in two regimen: diary (DS) and at interval of 96 hours (IS) in ovalbumin sensitized (OVA) balb/c mice. The control group (NS) received i.p. injections and aerosol challenge with normal saline. Starting at day 34 the OVA animals were treated with 10mg/ml salbutamol by inhalation during 15 minutes per day in both regimen: DS and IS. The mice were sacrificed at day 60 that corresponded the fourthly eight hours after last OVA and/or salbutamol exposure. At experimental day, mice were anesthetized with i.p. injection of sodium pentobarbital, tracheostomized, entubed and the abdominal aorta sectioned. We followed with collecting of bronchoalveolar lavage (BAL) and lungs to histopathology studies. In the BAL, total cells and differential leukocytes were quantified, while in the lung sections, the EPO⁺ and LMN in airways wall and parenchyma septa were evaluated. Also, we sampled the blood to evaluate the effects of salbutamol on anaphylactic IgE antibodies expression. The inflammatory model (OVA animals) produced a significant increase of BAL total cells, BAL eosinophils and neutrophils, and LMN cells and EPO⁺ eosinophils in the airways and in the parenchyma. Diary salbutamol treatment decrease significantly BAL eosinophils and neutrophils, while the IS group showed a diminution of BAL neutrophils and LMN cells in the alveolar septum. Both salbutamol treatments produced significant decline of EPO⁺ cells in the lung parenchyma. Despite the changes in the cellular patterns, the salbutamol did not affect the IgE antibodies expression. So, we can concluded that salbutamol present an immunomodulatory activity observed by reduction of eosinophils in the BAL and lung parenchyma, but did not achieve the values of saline control group.

Keywords: albuterol, ovalbumin, balb/c mice, inflammation, bronchoalveolar lavage, and pulmonar eosinophilia

Introdução

1.1. ASMA

A asma, uma doença de vias aéreas, já era descrita pelos antigos egípcios há mais de 3500 anos atrás nos papiros de Eber. Essa doença aparece em *Ilíada*, de Homero, e o nome até hoje utilizado foi adotado por Hipócrates, que em grego significa doença de respiração penosa ou pouco fôlego. O tratamento preconizado para a asma era a administração de um indutor de excreção de catarro, que consistia de uma mistura de *livanoton* com vinho doce e *alousia* (cocção de cinzas fervidas). Outros sugeriam o uso de *katapotia*, um decocto de uma espécie de pinhão misturada ao mel. Os médicos bizantinos utilizavam *katapotia* feita a partir de várias substâncias químicas como *lythargyros*, cobre, pedra persa e raízes de diversas plantas (Ramoutsaki *et al.*, 2002).

Sabe-se que, em 1190, Moses Maimonides escreveu o primeiro tratado médico sobre a asma para o Príncipe Al-Afdal, denominado *De Regimine Sanitatis ad Soldanum Babyloniae* (Regime de Saúde para o Sultão Babilônio), recomendando para o seu tratamento o consumo de sopa de galinha e abstinência sexual (NIH).

Em 1698, Sir John Floyer escreveu um tratado de asma (*Treatise of the Asthma*), que separou essa doença de outras causas de dispnéia. Algumas

décadas depois, o médico Inglês Henry Hyde Salter descreveu detalhadamente a patologia das asma em *On Asthma: Its Pathology and Treatment* (Sobre a Asma: Sua Patologia e Tratamento), baseado em cuidadosas observações dos sintomas e das sensações dos pacientes, dessa forma incentivando outros médicos a utilizarem-se do exame físico, além da história clínica no diagnóstico da asma, e o uso de *belladonna* no seu tratamento (NIH).

O início do tratamento moderno surgiu com a extração de adrenalina das glândulas supra-renais por John Abe e Jokichi Takamine entre 1899 e 1901. Em 1946, von Euler isolou e demonstrou que a adrenalina metilada (noradrenalina) era o principal neurotransmissor simpático (Bannett, 1999; NIH). Apesar disso, um dos primeiros medicamentos broncodilatadores foi à base de efedrina, extraída da *Ephedra mahuang* (*Ephedra vulgaris*), muito utilizada pelas medicinas tradicional e milenar chinesa.

A asma, segundo o NIH, é definida como: *“uma doença inflamatória crônica de vias aéreas, na qual diversas células e seus elementos participam do processo, em particular, os mastócitos, os eosinófilos, os linfócitos T, os macrófagos, os neutrófilos e as células epiteliais. Em indivíduos susceptíveis, essa inflamação causa episódios recorrentes de chiado, dispnéia, aperto torácico e tosse. Esses episódios são associados a uma ampla, mas variada, obstrução ao fluxo de ar, geralmente reversível espontaneamente ou após tratamento. Essa obstrução, também está*

associada à existência de hiper-responsividade a uma variedade de estímulos” (NIH, 1998).

A mortalidade devido à asma tem caído nos últimos anos nos Estados Unidos da América, como foi relatado em um estudo publicado recentemente (Sly, 2004). Essa pesquisa mostra que houve aumento da mortalidade entre 1977 e 1994. Entretanto, houve redução, em 2000, para 1,6 casos por 100.000, possivelmente por melhora do tratamento dessa doença (Sly, 2004). Em um estudo realizado no Brasil entre 1993 e 1995, observou-se um aumento do diagnóstico de casos fatais da doença de 1 para 1,165 (Rio *et al.*, 2003). Shafazand & Colice (2004) relatam que apesar da queda da mortalidade por asma, a prevalência que havia caído 6% entre 1997 e 1999, e aumentado em 25% no ano de 2001, concluindo que, apesar da queda da mortalidade, é prematuro dizer que a epidemia da asma chegou ao fim nos Estados Unidos (Shafazand & Colice, 2004).

A asma causa um grande impacto sócio-econômico. Stevens *et al.* (2003) estudaram o impacto econômico da doença em crianças em idade pré-escolar e observaram que no Reino Unido, os custos de atendimento dessas crianças por causa dos sintomas da asma eram de 2,6 milhões de libras esterlinas (Stevens *et al.*, 2003).

1.2. FISIOPATOLOGIA DA ASMA

O processo fisiopatológico da asma, bem como a sua intervenção terapêutica, têm sido amplamente estudados nas últimas décadas, com o intuito de reduzir a morbidade e a mortalidade dessa doença que pode ser incapacitante, trazendo prejuízos pessoais e profissionais aos seus portadores.

Sabemos que a asma é desencadeada principalmente por exposição alergênica a antígenos provenientes de diversas fontes. Entre eles, podemos destacar aqueles relacionados às baratas (*Blatella germânica* e *Periplaneta americana*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Bromia tropicalis*), animais domésticos, pólen e a compostos químicos irritantes como perfumes, solventes orgânicos, pesticidas e metais. Entretanto outros fatores externos como a exposição ao ar frio, o uso de antiinflamatórios não-esteroidais (ácido acetil-salicílico), o exercício físico e fatores emocionais também podem desencadear ou agravar uma crise de sintomas de asma (Pereira *et al.*, 1998; NIH, 2002).

O mecanismo inflamatório da asma tem sido aprofundado nos últimos anos, havendo participação fundamental das seguintes células inflamatórias: mastócitos, eosinófilos e linfócitos Th2 (Kay, 1991).

As características histopatológicas do processo inflamatório da asma consistem no aumento de permeabilidade vascular, formação de exsudato (edema) e afluxo de mastócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e, predominantemente eosinófilos, do compartimento intra para o extravascular (Kay, 1991), além de hipersecreção de muco, descamação da superfície epitelial, uma importante produção de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG) e presença de mediadores inflamatórios como interleucinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, TNF- α e INF- γ), neurocininas e óxido nítrico (NO), dentre outros (NIH, 1998). Estes mediadores inflamatórios, principalmente histamina, podem levar à formação de edema perivascular e peribrônquico, recrutando células inflamatórias, principalmente eosinófilos, para a parede da via aérea, podendo ocasionar modificações irreversíveis na estrutura tecidual dos pulmões, como o espessamento da membrana basal, hiperplasia e hipertrofia da camada muscular lisa peribrônquica, produzindo um fenômeno conhecido como remodelamento das vias aéreas (NIH, 1998; Bousquet *et al.*, 1999).

Atualmente, sabe-se que a molécula de adesão intracelular I (ICAM-I) tem um papel crítico no processo de quimiotaxia de linfócitos T para o local da inflamação em asmáticos, com o aumento da sua expressão no lúmen

das vias aéreas de asmáticos (Stanciu & Djukanovic, 1998). Ainda foi observado que a ICAM-1 também está envolvida no processo de recrutamento de eosinófilos, no modelo de inflamação pulmonar induzida por ovoalbumina (OVA), em camundongos (Chin *et al.*, 1998).

Stämpfli *et al.*, em 1999, relataram que a interleucina 10 (IL-10) tem capacidade de alterar a resposta alergênica à OVA, promovendo a redução do recrutamento de células inflamatórias, possivelmente por meio da inibição do fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF).

Uma vez ativado os receptores Fc ϵ RI pela IgE alérgeno-específico na superfície dos mastócitos, há a degranulação por essa célula de substâncias pró-inflamatórias constituídas principalmente de histamina, PGD₂ e LTC₄ (Barnes *et al.*, 1998; Oettgen & Geha, 1999). Atualmente, sugere-se que o antígeno seja capturado pela IgM de superfície dos linfócitos B, internalizado e expresso por uma molécula de histocompatibilidade principal (MHC), de classe II, e apresentada para o receptor de linfócitos T (TCR). Esse processo ativará a expressão de CD40L (ligante de CD40), que irá interagir com o CD40 do linfócito B e promoverá a ativação da molécula STAT2 (Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 2), além de aumentar a expressão de B7, que ligando-se ao CD28 do linfócito T, ativará a expressão de IL-2 e IL-4 (Oettgen & Geha, 1999). A ativação concomitante de CD40-CD40L e de IL-4R (receptor de IL-4) promoverá a expansão clonal de linfócitos B e

desencadeará o “switch” para o isótipo IgE, promovendo aumento de produção desse anticorpo específico ao antígeno responsável pela ativação dessa resposta (Oettgen & Geha, 1999).

A ativação dos linfócitos T é dependente da captação do antígeno pelos macrófagos ou pelas células dendríticas, ambas células apresentadoras de antígenos (APC). Estas apresentam o antígeno ao TCR por meio de um peptídeo MHC de classe II. Sabe-se que a diferenciação do linfócito T para o fenótipo Th1 ou para o fenótipo Th2 dependerá da citocina secretada pelas células apresentadoras. Para a polarização Th2, além da apresentação do antígeno, a célula apresentadora deverá estimular os linfócitos com IL-10, conseqüentemente ativando a cascata do STAT4. Entretanto, para a polarização para o fenótipo Th1, é imprescindível a presença de IL-12, a qual é bloqueada por histamina, prostaglandina E2, β 2-agonista ou mesmo pelo óxido nítrico (Sinigaglia & D’Ambrósio, 2000).

Nos modelos de camundongos, os mastócitos possuem papel fundamental no controle do recrutamento de eosinófilos através da GM-CSF, IL-3, IL-4 e IL-5, observada por uma significativa redução do número de eosinófilos recuperados no lavado bronco-alveolar e na atividade de EPO (peroxidase eosinofílica) em camundongos deficientes de mastócitos (WBB6F₁/J-W/W^v), comparados ao grupo controle (WBB6F₁/J-W/W⁺), ambos sensibilizados com OVA (Kung *et al.*, 1995).

A asma possui duas fases após o desafio alergênico, que já estão bem caracterizadas. A fase imediata é onde ocorre ativação de mastócitos e outras células inflamatórias como o macrófago, dependente da reação específica IgE-antígeno nos receptores FcεRI de alta afinidade (Barnes *et al.*, 1998; Bousquet *et al.*, 2000). Nessa circunstância há uma degranulação de conteúdos de mastócitos como explicado anteriormente, além da secreção de outros mediadores pró-inflamatórios como eicosanóides e espécies reativas de oxigênio. Do ponto de vista histopatológico, podemos observar nesta fase inicial, ou também chamada de resposta primária, extravasamento dos capilares, formando edema na parede de vias aéreas e de vasos periféricos à via aérea, além de uma contração do músculo liso presente em brônquios e bronquíolos, formando preguiamento do epitélio das vias aéreas, e dessa forma reduzindo a área do lúmen. Junto a isso, observa-se uma redução do “clearance” mucociliar e aumento da síntese de muco, contribuindo também para a obstrução (Barnes *et al.*, 1998; Bousquet *et al.*, 2000). Conseqüentemente, o paciente apresenta dispnéia, uma condutância de vias aéreas reduzida e pode apresentar, nos casos mais graves, cianose e parada cardiorespiratória (Barnes *et al.*, 1998; Bousquet *et al.*, 2000).

Na fase tardia, ou também chamada de resposta secundária, ou específica, há o recrutamento de células inflamatórias ao local da inflamação, e a secreção de seus mediadores pró-inflamatórios. Esta fase ocorre após 3 a 4 horas do estímulo alergênico, com um pico que varia de 8

a 12 horas e a duração, muitas vezes, ultrapassa de 12 horas (O'Byrne *et al.*, 1987). Nesta fase há ativação de eosinófilos, linfócitos CD4+, basófilos, neutrófilos e macrófagos (Bousquet *et al.*, 2000). A principal célula que orchestra a inflamação é o linfócito T CD4+. A sua ativação, o polariza para o fenótipo Th2, quando citocinas características desse fenótipo são secretadas de forma a se ter uma resposta mais persistente. Observa-se nesta fase aumento de interleucina (IL)-2, IL-5 e GM-CSF (Bousquet *et al.*, 2000). Além disso, a expressão de quimiocinas como RANTES (Regulado sob ativação, expresso e secretado pelos linfócitos T), CCR3 e a eotaxina, além das citocinas, recrutam eosinófilos para a parede de vias aéreas (Barnes *et al.*, 1998; Rothenberg, 1999; Bousquet *et al.*, 2000; D'Ambrósio *et al.*, 2001).

Na inflamação crônica provocada pela asma, observam-se alterações histopatológicas que podem ser responsabilizadas pela obstrução das vias aéreas. No material obtido de asmáticos após óbito, observou-se dano epitelial, com descamação do mesmo, muitas vezes notando-se os corpúsculos de Creola (agrupamentos das células do epitélio das vias aéreas). A descamação epitelial promove maior sensibilidade e reatividade da superfície de vias aéreas aos agentes constritores (Barnes *et al.*, 1998). Também evidenciou-se o espessamento da membrana basal (*lamina reticularis*), que pode contribuir aumentando a rigidez da parede de vias aéreas, auxiliando em maior resposta na mecânica respiratória da asma (Barnes *et al.*, 1998).

Atualmente, muito se fala da relação da inflamação de vias aéreas e o processo de remodelamento das mesmas, tentando-se uma associação às modificações de mecânica respiratória da asma, caracterizada pela obstrução de vias aéreas.

Desconhece-se o papel dos neutrófilos na asma, mas sabe-se que assim como os macrófagos, estas células têm capacidade de fazer fagocitose e expressar antígenos junto aos peptídeos de histocompatibilidade principal. Os neutrófilos têm a capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-8, que são potentes quimioatratores neutrofílicos (Xiu *et al.*, 1995; Page *et al.*, 1999). Além disso, estas células podem produzir produtos reativos de oxigênio e elastases, ambas participando para aumentar a lesão de vias aéreas e induzir o processo de remodelamento das mesmas (Lindén & Adachi, 2002), algumas vezes com estímulo proliferativo do músculo liso (Huang *et al.*, 2004).

No caso dos eosinófilos, seu papel na asma foi amplamente estudado. O eosinófilo, uma célula polimorfonuclear é produzida na medula óssea através do seu precursor mieloblasto, que diferencia-se em pró-mielócito eosinófilo e mielócito eosinófilo (Junqueira & Carneiro, 2004). A sua produção é regulada por vários fatores de crescimento, entre eles a IL-3, a IL-5 e o GM-CSF (Clutterbuck *et al.*, 1989). Essa célula pode ser dividida em duas subpopulações em relação à presença de peroxidase, ou seja, uma delas

armazena EPO (peroxidase eosinofílica) e a outra não. A linhagem EPO negativa armazena somente a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP) e a Proteína X Eosinofílica/Neurotoxina Derivada de Eosinófilos (EPX/EDN). Enquanto isso, os grânulos de EPO são pesados e apresentam também a MBP (Proteína Básica Principal) (Venge, 1998).

Os eosinófilos expressam também espécies reativas de oxigênio, embora não tão eficientes como os neutrófilos, além de produzirem prostaglandinas (PGE₂), leucotrienos (LTC₄) e fator ativador de plaquetas (PAF). Os grânulos eosinofílicos apresentam enzimas como a gelatinase, a arilsulfatase B, a histaminase e a outras enzimas com atividade fosfolipase, cujas funções ainda não estão claras (Bradley *et al.*, 1991). Estas células também expressam citocinas com atividade pró-inflamatória como IL-2, IL-6, IL-8, TGF- α , TGF- β e GM-CSF (Bradley *et al.*, 1991; Venge, 1998).

A EPO, é uma proteína com massa molecular total de 67kDa, duas cadeias, sendo a leve com massa de 15kDa e a cadeia pesada com massa igual a 52kDa. A peroxidase, junto ao tiocianato, haletos e peróxido de hidrogênio, constitui um potente agente citotóxico com capacidade de matar parasitas, mas também pode aumentar a permeabilidade microvascular. Observou-se que a EPO também pode promover a liberação de histamina dos mastócitos e causar agregação plaquetária (Yoshikawa *et al.*, 1993). A EPO junto a MBP pode agir como um indutor autócrino da degranulação eosinofílica, aumentando a expressão de IL-8 e, conseqüentemente,

promovendo o recrutamento de outros eosinófilos (Venge, 1998). É obvio que não podemos esquecer da eotaxina, membro da família das quimiocinas CC, que possui papel essencial no tráfego de eosinófilos do intravascular, atravessando o endotélio, para a mucosa (Rothenberg, 1999).

Hoje, acredita-se que a asma também seja uma doença de pequenas vias aéreas. Conseguiu-se demonstrar, em estudos experimentais, sua contribuição em até 20% da resistência total (Macklem, 1998). A principal diferença entre essas vias aéreas e as grandes é a área de secção transversa, que é maior nestas últimas. Considerando que o fluxo é mantido constante em toda a via aérea, como a velocidade é dependente da área transversa e é menor nas pequenas vias aéreas, nelas encontramos um fluxo laminar pleno, enquanto que nas grandes vias aéreas, a velocidade é bem maior, podendo ocorrer turbulências (Macklem, 1998). Além disso, é possível observar uma “linha” líquida na superfície das pequenas vias aéreas com característica surfactante com baixa tensão superficial, prevenindo-as de fecharem a um reduzido volume pulmonar (Macklem, 1998).

Neste nível das vias aéreas, há alterações semelhantes à aquelas observadas em vias aéreas maiores, como já descrito, onde se vê inflamação extensa com característica eosinofílica, além de mudanças estruturais da parede, com dano ao epitélio e espessamento da lâmina reticular. Pode-se ter, também, formação de rolha de muco no lúmen,

proveniente das glândulas secretoras (Roche, 1998). Kuwano *et al.* (1993) e Carrol *et al.* (1996) relatam aumento na camada muscular dos bronquíolos de pacientes asmáticos, que juntamente às alterações descritas, pode participar no processo de responsividade brônquica e na persistência dos sintomas da asma. Em estudo conduzido com biópsia de 16 pacientes asmáticos, observou-se a presença maciça de eosinófilos MBP positivas e linfócitos T, em vias aéreas com diâmetro menor ou igual a 2mm, comparadas às vias aéreas centrais do mesmo paciente, sugerindo que a gravidade da asma é dependente da localização do processo inflamatório eosinofílico, corroborando para a teoria na qual as pequenas vias aéreas são as responsáveis pela obstrução na asma (Hamid *et al.*, 1997). Tal resultado demonstra uma implicação tanto para o diagnóstico, quanto para a terapêutica do processo inflamatório, pois os corticosteróides inalatórios não conseguem alcançar essas pequenas vias aéreas, reduzindo a eficiência do tratamento antiinflamatório (Hamid *et al.*, 1997).

1.3. ASMA E A HIPER-REATIVIDADE

Inicialmente, é importante deixar claro que hiper-reatividade é diferente de sensibilidade. Uma pessoa ou animal é hipersensível, quando há um sinal ou sintoma iniciado por uma exposição a um estímulo alergênico ou farmacológico, em dose tolerada por uma pessoa ou animal normal (Johanson *et al.*, 2004). Enquanto que a hiper-reatividade é a associação da

hipersensibilidade com o aumento da resposta máxima observada. Tais parâmetros mensurados poderiam ser sintomatológicos (por exemplo, frequência de tosse ou de dispnéia) ou fisiológicos (por exemplo, volume expiratório forçado, resistência das vias aéreas, complacência pulmonar, etc).

O processo de hiper-responsividade de vias aéreas está diretamente relacionado com a contração da camada muscular dessas estruturas, cujas alterações, como aumento da massa ou da contratilidade dessas fibras musculares, podem resultar em exacerbação da resposta, quando comparada a sujeitos normais, observada por doses menores de agentes constritores. Além disso, o processo inflamatório e a hiperplasia das glândulas secretoras de muco, principalmente das células caliciformes, irão aumentar a secreção de muco, além do recrutamento de células inflamatórias para o lúmen. Esses fatores intrínsecos e extrínsecos resultam em obstrução do lúmen das vias aéreas, observada pelos sintomas de dispnéia, de cianose e de chiado torácico, além de alterações das propriedades mecânicas pulmonares (Solway & Fredberg, 1997; Liu *et al.*, 1998).

Uma das formas de se mensurar essa hiper-responsividade é por meio da coleta de dados fisiológicos, no caso de valores de função pulmonar em humanos, e de avaliação da mecânica do sistema respiratório em

experimentos animais. Em ambos casos é lícito o uso de agonistas broncoconstritores.

O uso do teste de reatividade brônquica induzida por broncoconstritores não alergênicos, como a metacolina e a acetilcolina, são extremamente úteis para avaliar o grau de contração e a responsividade da camada muscular das vias aéreas, enquanto que a histamina ou o leucotrieno avaliam se a resposta alergênica está exacerbada.

Dentre os agentes broncoconstritores, o uso da metacolina, um análogo β -metilado da acetilcolina para estabilizar a molécula, é o mais difundido para as atividades de pesquisa do tônus da via aérea. Fowler *et al.* (2000) descrevem o uso de metacolina e AMP para estudar a relação da gravidade da asma e os genótipos do receptor β_2 -adrenérgico, mostrando a existência de uma relação entre a glicina presente no códon 16 e o aumento da resposta à metacolina. Os autores deste trabalho concluem que existe uma possível relação entre a responsividade brônquica e a estrutura modificada do receptor β_2 -adrenérgico, reduzindo o papel protetor dos agonistas deste receptor (Fowler *et al.*, 2000).

O sistema respiratório pode ser dividido em dois componentes: (1) componente externo, constituído pela caixa torácica; e (2) componente visceral, constituído pelas vias condutoras e pelo pulmão (Maselli & Paciocco, 2000). Com os valores de fluxo de ar e de pressões traqueais, ou

mesmo pulmonares, pode-se calcular os valores de resistência e de elastância do sistema respiratório / pulmonar, como aqueles realizados em trabalhos prévios do nosso laboratório.

Atualmente, duas novas estratégias têm sido descritas na literatura. A primeira envolve a avaliação da responsividade do sistema respiratório de roedores, por meio do uso de câmara barométrica, fechada de forma hermética, na qual mensura-se a pressão dentro desse sistema contendo o animal. Com a respiração do animal, há a captação de um “ruído” através de um transdutor de pressão, que é convertido em sinais elétricos. Após filtragem desse “ruído” consegue-se observar uma onda derivada da respiração nasal do animal e dessa forma é calculada um valor denominado Pehn, que correlaciona-se bem com a responsividade, apesar de suas limitações (Dohi *et al.*, 1999; Albertine *et al.*, 2002; Hantos & Brusasco, 2002; Lundblad *et al.*, 2002; Melgert *et al.*, 2004). Recentemente, com o uso da técnica de oscilação forçada (FOT), na qual um conjunto de ondas senoidais denominado *perturbação* é gerada pelo pistão do ventilador, consegue-se valores de mecânica para cada frequência aplicada e separar componentes de vias aéreas proximais, vias aéreas distais e de parênquima pulmonar, por meio da análise das impedâncias (Bates & Irving, 2003; Evans *et al.*, 2003; Moriya *et al.*, 2003; Sly *et al.*, 2003). Finalmente, a avaliação mecânica das tiras subpleurais de tecido pulmonar (*strip*) é uma ferramenta útil, na qual a interação tecido-vias aéreas pode ser melhor estudada, inclusive adicionando-se mediadores farmacológicos. Essa última

técnica possui a vantagem de não se necessitar do animal vivo e não haver influência do efeito anestésico, mas com a desvantagem de não haver a interação pulmão-circulação (Sakai *et al.*, 2001; Leite-Junior *et al.*, 2003).

Diversos estudos têm por objetivo, observar a existência de uma correlação entre a inflamação pulmonar e a hiper-responsividade brônquica, com intenção lícita de utilizar este último dado como índice do processo inflamatório. Entretanto, tais estudos têm resultados divergentes, talvez pela complexidade e pela doença asma ter característica multifatorial.

Dohi *et al.* (1999) correlacionaram o nível de hiper-responsividade específica ao alérgeno, medida esta feita através de avaliação de pletismografia barométrica, com índice inflamatório da parede de vias aéreas.

Estudo de Hamelman *et al.* (1999) demonstra que a inflamação alérgica e a hiper-responsividade de vias aéreas induzida por OVA, são dependentes de expressão de interleucina 5 (IL-5). Entretanto não são modificadas por IgE alérgeno-específico ou por linfócitos B, fato observado após experimentos com linhagem de camundongos deficientes em linfócitos B.

Cieslewicz *et al.* (1999) tentaram correlacionar a responsividade brônquica com a IL-5 e o infiltrado eosinofílico. No entanto observou que somente na resposta tardia, os eosinófilos correlacionavam-se com aumento

proporcional da resposta de mecânica respiratória. A ausência de IL-5 ou de eosinófilos poderia abolir a responsividade tardia, mas não a imediata (Cieslewicz *et al.*, 1999). Em modelo murino, Wilder *et al.* (1999) observaram que apenas as presenças de IgE OVA-específica, eosinofilia e inflamação pulmonar são insuficientes para induzir a hiper-responsividade de vias aéreas, além de observarem que é possível obter um modelo de hiper-responsividade sem a presença de eosinofilia. Os autores hipotetizam que os linfócitos T CD4⁺ seriam os responsáveis pela produção da hiper-responsividade brônquica.

Mäkelä *et al.* (2000) demonstraram que a IL-10 é a responsável pela indução da hiper-responsividade brônquica, confirmando os resultados de Wilder *et al.* (1999). Os camundongos IL-10 ^{-/-} sensibilizados, com presença de inflamação eosinofílica na parede de vias aéreas, apresentaram valores de resistência pulmonar e de complacência pulmonar iguais aos animais não sensibilizados, enquanto que os animais “wild-type” que expressavam IL-10 e que foram submetidos aos mesmos procedimentos de sensibilização, apresentaram hiper-responsividade com valores máximos 2,5 vezes maiores e início da resposta a doses menores de metacolina.

Cheng *et al.* sugeriram o bloqueio da IL-9 para a redução da responsividade brônquica e da inflamação eosinofílica, corroborando com a tese de que a célula promotora, tanto da resposta mecânica como da celular, na asma, é o linfócito T CD4⁺ (Cheng *et al.*, 2002).

1.4. MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA

Entre vários modelos de inflamação de vias aéreas disponíveis para o estudo da asma, a cobaia representa um bom modelo de responsividade brônquica, com fácil indução da resposta alérgica através de múltiplas exposições ao aerossol de ovoalbumina (Tibério *et al.*, 1997). Entretanto, as cobaias podem apresentar efeito de tolerância após longos períodos de exposição ao alérgeno, além da indisponibilidade de anticorpos comerciais, utilizados para a avaliação de aspectos celulares da inflamação, na tentativa de elucidar mecanismos moleculares. Dessa forma, observamos o uso crescente de camundongos, por apresentar menor custo de manutenção em biotério, disponibilidade de reagentes e anticorpos, possibilidade do uso de técnicas laboratoriais sofisticadas (por exemplo: citometria de fluxo, uso de sondas de cDNA, RT-PCR, e imunohistoquímica direta e por fluorescência), e a possibilidade de manipulação genética nos animais para produzir animais transgênicos, *Knock-Out* and *Knock-In* de determinadas seqüências gênicas.

Alguns modelos tentam reproduzir a asma humana em camundongos, através de um estágio de sensibilização, geralmente por injeção intraperitoneal de ovoalbumina, associada a um adjuvante. O adjuvante mais utilizado para os modelos murinos é o hidróxido de alumínio, conhecido como alúmen.

Takeda *et al.* (2001) demonstraram que a escolha da linhagem de camundongos Balb/c ou C57BL/6, no modelo de inflamação pulmonar à OVA, leva a uma diferente resposta de hiper-responsividade à metacolina, possivelmente por causa da diferença de distribuição de eosinófilos nesses animais. Nos Balb/c há eosinófilos predominantemente em paredes de vias aéreas, produzindo maior resposta de complacência pulmonar à metacolina, enquanto que nos C57BL/6, a mesma encontra-se difusa e com menor resposta ao agonista colinérgico (Takeda *et al.*, 2001).

Inman *et al.* (1999) observaram aumento de eosinófilos no lavado broncoalveolar, em camundongos Balb/c sensibilizados e desafiados com OVA, 12 horas após o último desafio intranasal, atingindo uma resposta máxima entre 24 e 48 horas. O mesmo foi observado para os parâmetros de responsividade de vias aéreas e de unidades formadoras de colônias de eosinófilos na medula óssea (Inman *et al.*, 1999).

Tomkinson *et al.* (2001) utilizaram um modelo que, após sensibilização intraperitoneal nos dias 0 e 14 em camundongos Balb/c, desafiou os animais com uma única instilação de ovoalbumina intranasal. Observaram aumento da responsividade brônquica à metacolina, que atingia pico 48 horas após o desafio. A inflamação eosinofílica iniciou-se 24 horas após a instilação intranasal do antígeno, atingindo valores máximos entre 48 e 96 horas, mantendo a eosinofilia no lavado broncoalveolar por até 8 dias, mas com o

pico de EPO em 48 horas. A inflamação neutrofílica nesse modelo ocorre em uma fase precoce da fase inflamatória (entre 8 e 24 horas após o desafio antigênico) (Tomkinson *et al.*, 2001). Essas observações serviram como base teórica para a escolha do tempo de sacrifício dos animais deste estudo.

Apesar dos modelos de Inman *et al.* (1999) e de Tomkinson *et al.* (2001) mostrarem aumento da hiper-responsividade junto ao aumento da inflamação pulmonar, Wilder *et al.* (1999) evidenciam que não existe relação entre a responsividade de vias aéreas e os níveis de eosinófilos mensurados no lavado broncoalveolar e de IgE específica à OVA. No modelo proposto por Wilder *et al.*, os animais foram sensibilizados por via intraperitoneal nos dias 0 e 5, e expostos ao aerossol de OVA no décimo segundo dia. Os camundongos Balb/c deste estudo não produziram inflamação eosinofílica, apesar de apresentarem hiper-responsividade de vias aéreas à metacolina (responsividade não específica). No entanto, os camundongos de linhagens C57BL/6 e B₆D₂F1 apresentaram valores elevados de eosinófilos e responsividade de vias aéreas (Wilder *et al.*, 1999).

Takeda *et al.* (2001) relatam que existe acúmulo de eosinófilos, tanto em parede de vias aéreas quanto em parênquima pulmonar em camundongos Balb/c. Leong & Huston descrevem em seu artigo quais considerações devem ser feitas para a obtenção de um modelo de asma adequado à pergunta do pesquisador. Esses autores sugerem que injeções intraperitoneais nos dias 0 e 14, com desafios intranasais nos dias 25 a 28

promovem uma resposta máxima de responsividade de vias aéreas. Além disso, doses menores de OVA, como 10 μ g são imunogênicas, enquanto que a administração de 1000 μ g não consegue promover resposta inflamatória e mecânica (Leong & Huston, 2001).

Muitos estudos têm discutido a necessidade de se obter um modelo de remodelamento das vias aéreas, uma circunstância condizente com a situação clínica de pacientes asmáticos persistentes graves. Shinagawa & Kojima (2003) tentaram obter tal modelo, comparando em linhagens murínicas, diferenças de características inflamatórias e estruturais das vias aéreas. Em seu estudo, os autores afirmam que o processo de indução da inflamação por meio de injeção intraperitoneal de OVA e desafios inalatórios, produziu significativa eosinofilia nas duas semanas iniciais de desafios, e que foi reduzida nas semanas seguintes. Apenas no camundongo Balb/c observaram a persistência da inflamação durante uma semana adicional. Os autores propõem, então, o uso da linhagem A/J, que produziu espessamento da parede peribrônquica, com formação de inflamação nessa parede de vias aéreas e hiperplasia de células caliciformes nos animais OVA. O remodelamento foi confirmado pelo ensaio de determinação de hidroxiprolina, estando aumentado após 12 semanas de desafios inalatórios na linhagem A/J (Shinagawa & Kojima, 2003).

1.5. ASMA E TRATAMENTO

No passado, o tratamento da asma consistia apenas em medicamentos que aliviassem os sintomas da constrição das vias aéreas, por meio do uso de agentes adrenérgicos ou seus análogos broncodilatadores. Atualmente, diversos medicamentos têm sido utilizados, para tentar bloquear, ou ao menos reduzir, a atividade inflamatória das vias aéreas e a responsividade brônquica, que produzem os sintomas da asma, e conseqüentemente, são responsáveis pelas seqüelas dessa doença.

Os medicamentos utilizados na asma incluem-se nas seguintes categorias terapêuticas: metilxantinas (ex.: teofilina e aminofilina), estabilizadores da membrana de mastócitos (representados pelos cromoglicatos), broncodilatadores agonistas de receptor β_2 -adrenérgico (ex.: salbutamol, fenoterol, isoprenalina, etc), anti-leucotrienos (ex.: montelucaste, zafirlucaste), anti-IgE e os corticosteróides inalatórios e sistêmicos (ex.: budesonida, fluticasona, etc).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH), em seu consenso para o tratamento da asma de 1998, preconiza o uso de quatro passos para o tratamento da asma, de acordo com a gravidade dos sintomas. O paciente com quadros graves inicia no passo 4 (step 4), que preconiza o uso de altas doses de corticosteróide inalatório como tratamento

antiinflamatório, concomitantemente com broncodilatador de longa ação ou teofilina de ação prolongada, além da prescrição de beta2-agonista de curta ação, somente a ser utilizado em caso de surgimento de sintomas. Quando o doente melhor e apresenta sintomas de um paciente persistente moderado, o tratamento recomendado é o uso de corticosteróide inalatório ou o uso concomitante de corticóide inalatório e de beta2-agonista de longa ação, além do medicamento para o controle de sintomas.

No caso de asma persistente leve, o guia recomenda o uso de baixas doses de corticóide inalatório ou o uso de cromoglicato, que agem como estabilizadores da membrana de mastócitos, evitando que ocorra a degranulação de seu conteúdo pelos mastócitos após estímulo alergênico. Os pacientes que alcançam os sintomas que os classificam como asmáticos intermitentes leve, podem utilizar-se de beta2-agonista quando necessário, para o alívio dos sintomas da asma (NIH, 1998).

Como pode se observar, o uso de um medicamento antiinflamatório da classe do corticosteróide é imprescindível para o tratamento da asma. A ação desses medicamentos ocorre após a sua passagem para o citoplasma, aonde irá se ligar aos receptores de glicocorticóide (GR). Esse receptor possui uma região de “Zinc Finger” (ou “dedo de zinco”, porção do receptor com aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, aos quais quatro coordenam uma molécula de zinco, propiciando estabilidade a estrutura que ligará com o DNA ou ao RNAm – Nelson & Cox, 2002) que faz a sua

interação com o DNA, impedindo a transcrição de citocinas e outros componentes pró-inflamatórios. Além disso, os corticóides junto a seus receptores poderão se ligar ao Fator Nuclear κ -B (NF- κ B) e à Proteína Ativadora-1 (AP-1) impedindo-os de transcrever proteínas pró-inflamatórias (Barnes *et al.*, 1998).

O nosso organismo é enervado pelo sistema nervoso central (SNC) e pelo sistema nervoso periférico (SNP). O sistema nervoso periférico é constituído de fibras simpáticas, cujo mediador principal é a acetilcolina, e de fibras parassimpática, onde o mediador farmacológico é a norepinefrina. Além disso, podemos observar uma inervação não colinérgica e não adrenérgica (NANC), cujas fibras degranulam, no processo sináptico, a substância P, a neurocinina A e o VIP (proteína vasoativa intestinal). A ação da acetilcolina pode promover a contração das fibras musculares lisas, sobretudo a aquelas que estão nas vias aéreas. Enquanto que, a norepinefrina, conhecida como noradrenalina, antagoniza a atividade colinérgica (Barnes *et al.*, 1998).

No passado, por acreditar que a asma era uma doença da musculatura lisa de vias aéreas, o uso de medicamentos anti-colinérgicos era bem difundido. Sabe-se que as fibras musculares lisas das vias aéreas podem ser estimuladas através de nervos autonômicos aferentes, sendo o seu mediador farmacológico a acetilcolina, que exerce sua função em receptores muscarínicos M1, M2 e M3. Os fármacos anti-colinérgicos, cujas estruturas

são baseadas na atropina, extraída da *Atropa beladonna*, são compostos quaternários de amônia da atropina, como por exemplo, o brometo de ipratrópio. Essa classe de medicamento foi abandonada, por não oferecer uma broncodilatação tão potente quanto às obtidas com os agonistas β_2 -adrenérgicos (Barnes *et al.*, 1998).

Em alguns casos de asma, o uso de antagonista de leucotrienos tem demonstrado uma boa atuação antiinflamatória. Os leucotrienos que participam do processo inflamatório da asma são LTC₄, LTD₄ e LTE₄. A síntese dos leucotrienos inicia-se com a liberação do ácido araquidônico (AA) dos fosfolípidos da membrana, por meio da fosfolipase A2 (PLA2). O ácido araquidônico é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) por meio das enzimas FLAP (5-lipooxigenase ligada à membrana) e 5-lipooxigenase. O leucotrieno A₄ é transformado então em LTC₄ por meio da LTC₄ sintase (Piper & Samhoun, 1987; Campbel & Halushka, 1996; Leick-Maldonado, 2002). Diversos medicamentos que atuam antagonizando os receptores de leucotrienos estão disponíveis no mercado brasileiro, entre eles, o montelucaste sódico e o zafirlucaste. Além desses antagonistas, uma outra classe de anti-leucotrienos pode ser utilizada, que age inibindo a 5-lipoxigenase. Como exemplo dessa categoria, temos o Zileuton (Drazen *et al.*, 1999).

1.6. BRONCODILATADORES AGONISTAS DE RECEPTOR BETA2-ADRENÉRGICO

Dentre os tratamentos utilizados para a asma, é comum o uso de agonista do receptor β_2 -adrenérgico, sendo útil para a reversão dos sintomas de dispnéia e de aperto torácico. No Brasil, temos à disposição dos pacientes os sais dos seguintes compostos: salbutamol, fenoterol, terbutalina, bambuterol, salmeterol e formoterol.

Os agonistas broncodilatadores β_2 -adrenérgicos têm a sua ação sobre os receptores adrenérgicos do tipo 2, na superfície da membrana celular de fibras musculares lisas da parede de vias aéreas, mastócitos, linfócitos T e nas células do epitélio respiratório. Esse receptor de 413 amino-ácidos apresenta sete domínios transmembrânicos na conformação α -hélice, com três alças intra-celulares e o mesmo número na porção extracelular. Além disso, a cauda amino terminal, localizada na porção extracelular do receptor, apresenta glicosilações que mantêm a sua estrutura estável (Strader et al., 1989; Barnes, 1995).

Uma vez ativado o receptor por meio da noradrenalina ou através do uso de fármacos agonistas desse receptor, há o desacoplamento da proteína G estimuladora, separando a subunidade α das demais β e γ , ativando a enzima adenil-ciclase presente na membrana celular, que converte adenosil-trifosfato (ATP) em adenosil-monofosfato cíclico (AMPc). O aumento do

gradiente intracelular de AMPc, produz a ativação da Proteína Kinase A (PKA), e conseqüentemente a inibição da fosforilação da cadeia leve de miosina, inibição da hidrólise de fosfoinositol, e aumento da troca $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$, levando à queda de Ca^{2+} intracelular (Barnes, 1995; Barnes *et al.*, 1998).

Os agonistas β_2 -adrenérgicos apresentam uma estrutura básica semelhante à da adrenalina. A estrutura geral desse fármaco é composta de um anel benzênico com a presença de dois substituintes polares, geralmente duas hidroxilas, ou uma hidroxila e um grupo $-\text{CH}_2\text{-OH}$, este último dificultando a sua degradação pela catecol-O-metiltransferase (COMT). Este anel catecol está separado da porção amino por dois carbonos, havendo a presença de uma hidroxila no carbono logo adjacente ao anel benzênico. A substituição do carbono α do grupo amino, aumenta a resistência à sua oxidação pela monoamino oxidase (MAO), tornando-o seletivo para receptor β_2 -adrenérgicos, apesar de apresentar menor potência comparada com a isoprenalina. Além disso, a presença de um grupo polar grande no carbono α da porção amino aumenta a duração da atividade broncodilatadora, interagindo com maior afinidade no quarto domínio transmembrânico do receptor β_2 -adrenérgico (Barnes, 1995; Barnes *et al.*, 1998).

Esse receptor participa no relaxamento do músculo liso peribrônquico levando ao alívio dos sintomas da asma, entretanto o seu papel sobre as células inflamatórias ainda não foi totalmente elucidado. Evidências demonstram a redução do processo alérgico, por meio da ação dos β_2 -

agonistas sobre os mastócitos, reduzindo a liberação do conteúdo intracelular pró-inflamatório após estímulo alergênico (Petersen & Skov, 1999).

Farmer & Pugin (2000) mostraram que os agonistas β_2 -adrenérgicos possuem capacidade de modular a atividade inflamatória em monócitos, através da redução da degradação da molécula I κ B (molécula inibidora do fator nuclear κ -B), mediada pelo aumento intracelular de AMPc. Em modelos de doenças mediadas pelos linfócitos Th1, o salbutamol promove inibição seletiva de IL-12, após estímulo *in vitro* com LPS em cultura de células dendríticas (Panina-Bordignon *et al.*, 1997).

Um estudo com cultura de eosinófilos e fibroblastos, onde essas células foram incubadas com budesonida (um corticósteróide utilizado no tratamento da asma) e com formoterol (um agonista β_2 -adrenérgico de efeito prolongado), mostrou que o β_2 -agonista promoveu a inibição da atividade eosinofílica somente através da via inibitória dos fibroblastos, mediada por GM-CSF (Spoelstra *et al.*, 2000).

Twentyman *et al.* (1990), mostraram que os agonistas β_2 -adrenérgicos de longa ação possuem atividade protetora contra a asma induzida por alérgenos, onde pacientes que utilizaram uma dose única de salmeterol apresentaram melhora significativa da função pulmonar após desafio específico (com alérgeno), e redução da responsividade à histamina. Em

cobaias, o tratamento com formoterol reduziu a indução do extravasamento plasmático nas vias aéreas induzido por bradicinina, mostrando efeito preventivo da formação de edema da parede de vias aéreas (Erjefält & Persson, 1991).

Durante anos, os clínicos estiveram preocupados com o papel dos broncodilatadores agonistas de receptor β_2 -adrenérgico sobre a mortalidade de pacientes asmáticos, o que pode ser observado através de um editorial publicado no New England Journal of Medicine em 1992, sob o título “O dilema do β -agonista” (Burrows & Lebowitz, 1992). Alguns estudos têm relatado uma associação entre o uso de β_2 -agonista e mortalidade por asma. Sugere-se que um dos fatores que causa a morte por asma é o uso crônico e contínuo por agentes β_2 -agonistas de curta ação (Rea *et al.*, 1986; Crane *et al.*, 1989; Grainger *et al.*, 1991; Abramson *et al.*, 2001). Spitzer *et al.* (1992a, b) correlacionaram o aumento da mortalidade de pacientes asmáticos ao uso regular de β_2 -agonistas, principalmente de fenoterol. Em um estudo caso-controle na Nova Zelândia, observou-se aumento da mortalidade, por meio da deterioração do controle da doença, causado por uso regular dessa classe de fármaco (Crane *et al.*, 1989; Kamada, 1994).

Outros estudos clínicos analisaram pacientes asmáticos, com sintomas leves e moderados, que foram submetidos ao tratamento regular com salbutamol. Mostraram tendência à piora da função pulmonar, associada a aumento da hiper-responsividade de vias aéreas após teste com metacolina

e alérgenos (Cockcroft *et al.*, 1993; Gauvreau *et al.*, 1997). Sears *et al.* (1990) estudando 89 pacientes com asma estável, durante 24 semanas, observaram que apenas 17 pacientes apresentaram melhora após período de tratamento com fenoterol regular comparado com o período de tratamento com placebo, enquanto que 40 pacientes (70%) apresentaram piora dos sintomas após tratamento com fenoterol (Sears *et al.*, 1990).

O aumento da morbidade e da mortalidade associado ao uso regular de β_2 -agonistas poderia estar relacionado com o aumento da hiper-responsividade induzida pelos alérgenos (Cockcroft *et al.*, 1993; Cockcroft *et al.*, 1995). Além disso, Bhagat *et al.* observaram que o uso regular de β_2 -agonistas pode levar à tolerância do efeito protetor à broncoconstrição, além de apresentar aumento da responsividade brônquica à metacolina após doses altas (800 μ g/dia) de salbutamol (Bhagat *et al.*, 1996; Bhagat *et al.*, 1995).

Mesmo após a cessão do tratamento regular com baixas doses de terbutalina, os efeitos adversos decorrentes do regime inadequado de tratamento com agonista β_2 -adrenérgico persistem (Wahedna *et al.*, 1993).

Os possíveis mecanismos da deterioração dos sintomas envolvem muitas especulações. O mais aceito, dentre eles, envolve a tolerância aos agentes broncodilatadores e a redução da proteção contra a broncoconstrição, ambos por causa do mecanismo de “down-regulation” dos receptores β_2 -

adrenérgicos da superfície das fibras musculares lisas peribrônquicas. Tal mecanismo pode envolver o seqüestro e a internalização desses receptores por meio de uma β -arrestina (Goodman *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Menard *et al.*, 1997) ou aumento da taxa de ocupação dos receptores, levando a uma retroalimentação negativa, reduzindo a síntese de-novo de receptores β_2 -adrenérgicos (Kamada, 1994; Barnes *et al.*, 1995; Kelsen *et al.*, 2000).

Especula-se, também que, o uso de β_2 -agonista poderia “mascarar” a inflamação da asma, pois há apenas a dilatação das vias aéreas, aliviando os sintomas da asma, mas não haveria redução do processo inflamatório. A aparente melhora da doença, levaria os pacientes a se exporem aos antígenos, aumentando o processo inflamatório (McIvor *et al.*, 1998).

O uso crônico dos agonistas β_2 -adrenérgicos poderia exacerbar a resposta inflamatória, principalmente a eosinofilia, através do aumento do recrutamento dessas células por meio do aumento da expressão de agentes quimiotáticos. Gordon *et al.* relatam que o uso regular de salbutamol aumenta a expressão de CXCL8/IL-8, CCL11/eotaxina, GM-CSF e TNF em 42%, e o principal mediador nesse estudo, responsável pelo recrutamento de eosinófilos após tratamento com salbutamol regular, é a CXCL8/IL-8 (Gordon *et al.*, 2003). Swystun *et al.* evidenciaram o aumento da degranulação de mastócitos produzindo maior resposta imediata ao alérgeno

e aumento de eosinófilos, em sujeitos asmáticos tratados por 10 dias com 800 μ g de salbutamol por dia (Swystun *et al.*, 2000).

Em contrapartida, o tratamento de cobaias sensibilizadas à OVA com formoterol, produziu melhora dos parâmetros de mecânica pulmonar, com aumento da condutância das vias aéreas e redução da quantidade de células totais obtidas no lavado broncoalveolar aos níveis observados em animais controles (Sugiyama *et al.*, 1992).

Estudo recentes das formas racêmicas do formoterol demonstram que os compostos (S,S)-formoterol exercem atividade pró-inflamatória mediada por aumento da expressão de interleucina (IL) 4 nos mastócitos, e dessa forma, contribuem para a alteração dos parâmetros inflamatórios, sem mudança na reatividade brônquica dos camundongos estudados, enquanto que a forma racêmica R-R não apresenta nenhum desses efeitos (Abraha *et al.*, 2004).

A dessensibilização é um fenômeno no qual a resposta celular está reduzida após estímulo constante, ou seja, nos receptores β_2 -adrenérgicos, o estímulo constante com agonistas poderia levar a uma redução ou mesmo à perda funcional da atividade broncodilatadora. Na cultura de músculo liso de vias aéreas, Penn *et al.* (1998) observaram que a dessensibilização aguda do receptor β_2 -adrenérgico está associada com a expressão excessiva de quinase, acoplada ao receptor acoplado à proteína G GRK2. Além disso, essa inativação do receptor β_2 -adrenérgico estaria associada

com a atividade da proteína quinase A (PKA). A sua inibição pela estaurosporina (inibidor da PKA) reverteria a dessensibilização dos receptores adrenérgicos, o mesmo podendo ser observado no epitélio de via aéreas (Kelsen *et al.*, 1995; Penn *et al.*, 1998). Aparentemente, a redução da resposta broncodilatadora não está associada com o número de leucócitos mononucleares, mas com a redução da expressão de receptores β_2 -adrenérgicos na superfície celular (Hayes *et al.*, 1996).

Apesar dos estudos acima citados mostrem efeitos deletérios dos β_2 -agonistas, diversos trabalhos clínicos e experimentais têm demonstrado o contrário, persistindo até hoje a controvérsia dos agonistas β_2 -adrenérgicos.

De acordo com as evidências observadas na revisão de literatura e citadas acima, planejou-se estudar, a princípio, qual o papel dos agonistas β_2 -adrenérgicos sobre a inflamação pulmonar e sobre a hiper-responsividade brônquica de vias aéreas e de compartimento tecidual em modelo de asma induzida por OVA em camundongos Balb/c.

Objetivos

1. Obter um modelo de inflamação pulmonar crônica e persistente, induzida por ovoalbumina, em camundongo Balb/c, cuja duração do processo seja ao menos de 4 semanas;
2. Estudar a influência dos tratamentos com salbutamol a cada 96 horas e diário no processo inflamatório de vias aéreas e do tecido pulmonar.

Métodos

3. MATERIAIS

3.1. REAGENTES

Acetona P.A., Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Azul de Evans, Sigma, EUA.

Cianeto de Potássio, Sigma Aldrich, EUA

Cloreto de sódio, Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Clorofórmio P.A., Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Tetrahydrocloridrato de 3'3'-diamino-benzidina (DAB), Sigma, EUA.

Eosina, Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Etanol P.A., Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Fosfato de Sódio Dibásico P.A., Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Fosfato de Sódio Monobásico P.A., Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil.

Hemacolor: Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil

Hematoxilina, Qeel, Brasil.

Hidróxido de Alumínio Gel – Al(OH)₃: Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil.

OCT: Tissue Freezing Médium, Leica Gmbt, Alemanha.

Ovoalbumina liofilizada: Advanced Nutrition Ltda, Rio de Janeiro, Brasil.

Paraformaldeído, Sigma, EUA.

Salbutamol, Glaxo Wellcome S.A., Rio de Janeiro, Brasil.

Salina Normal 0,9%: Baxter Hospitalar Ltda., São Paulo, Brasil.

3.2. EQUIPAMENTOS

Centrífuga Refrigerada, Beckman, EUA.

Citocentrífuga: Shandon, EUA.

Criostato, Leica Instruments, Alemanha.

Freezer -70°C, Forma Scientific (Forma, EUA)

Inalador ultrassônico, modelo Pneumoclear (Soniclear, São Paulo, Brasil)

Microscópio Óptico, Olympus, Japão.

Protocolo de Sensibilização e Tratamento com β_2 -agonista de Curta Ação

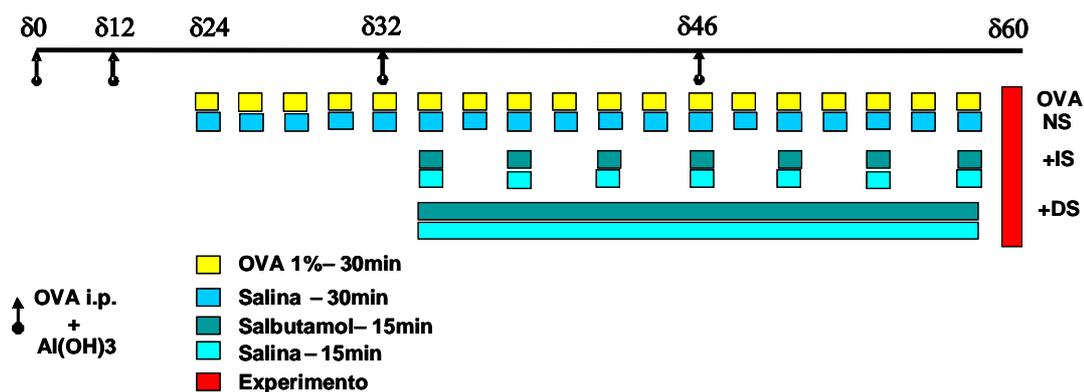


Figura 1. Protocolo de sensibilização com ovoalbumina (OVA) e tratamento com β_2 -agonista de curta ação. Pode-se observar a injeção i.p. de OVA+Al(OH)₃ nos dias (δ): 0, 12, 32 e 46. O sacrifício foi realizado 48 horas após o último desafio / tratamento com salbutamol (δ 58). Os grupos são: **NS** – salina normal, **OVA** – inflamado com ovoalbumina, **OVA+IS** – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e **OVA+DS** – inflamado e tratado com salbutamol diário.

4. MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos Balb/c, de 6 a 10 semanas de idade (20-25g), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos sob condições ambientais rigorosamente controladas no Biotério de Manutenção conjunto dos Laboratórios de Investigação Médica (LIM) 05, 20 e 65. Os animais receberam alimentos isento de ovoalbumina e água *ad libitum*. E foram retirados desse biotério somente para as exposições ao antígeno e/ou fármaco estudado e seus respectivos controles, e para a experimentação final. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Análise de Projetos para Pesquisa (CAPPesq: 663/00) do Hospital das Clínicas da FMUSP, responsável por analisar do ponto de vista científico, ético e moral, todos os projetos de pesquisa oriundos do Complexo Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da USP, independentemente se são realizados em humanos ou em animais de laboratório.

4.2. SENSIBILIZAÇÃO E INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO PULMONAR

Para atingir o protocolo de sensibilização e de indução da inflamação pulmonar por ovoalbumina, realizaram-se diversos experimentos pilotos, com o intuito de testar a via de administração do antígeno, a quantidade de desafios intra-peritoniais, o tempo de exposição ao aerossol de ovoalbumina e o tipo de ovoalbumina a ser utilizada nos experimentos. Durante a fase piloto, avaliamos os graus de inflamação pulmonar por meio de lavado broncoalveolar e histopatologia não quantitativa de pulmões, observando se houve a formação de infiltrado inflamatório peribrônquico, e se houve recrutamento de eosinófilos para o lavado broncoalveolar.

Foram injetados intraperitonealmente nos dias 1, 12, 32 e 46 uma solução de 0,2ml contendo 50µg de ovoalbumina liofilizada (Advanced Nutrition Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) adsorvida em 6mg de Al(OH)₃ (Pepsamar gel, Sanofi-Synthelabo S.A., Rio de Janeiro, Brasil). Nos dias 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 48, 50, 52, 54, 56 e 58 os animais foram expostos ao aerossol de ovoalbumina a 1%, durante 30 minutos. Os animais controles receberam injeção intraperitoneal de salina e hidróxido de alumínio e foram expostos durante 30 minutos ao aerossol de salina normal 0,9%, seguindo o mesmo protocolo para a ovoalbumina.

4.3. TRATAMENTO COM SALBUTAMOL

A partir do dia 32 os animais foram tratados com inalações de aerossol de uma solução de salbutamol 10mg/ml durante 15 minutos, imediatamente após o desafio antigênico. Conduzimos dois regimes de tratamento: um grupo de camundongos inflamados recebeu salbutamol a cada 96 horas (OVA+IS) e um segundo grupo recebeu tratamento diário (OVA+DS). O intervalo de tratamento OVA+IS foi escolhido após um estudo prévio na Disciplina de Clínica Geral, no qual se observou que os pacientes que usam o salbutamol de forma intermitente, em média o utilizam a intervalo de 96 horas. A concentração que se usou do medicamento seguiu a mesma do estudo anterior em cobaias (Kasahara, 2001). Resumidamente 10mg/ml preparada em salina a partir do produto comercialmente disponível (solução de salbutamol para inalação, Aerolin®).

4.4. CONTROLES

Os animais controles receberam injeção intra-peritoneal de salina normal + hidróxido de alumínio coloidal. Além disso, nos dias dos desafios inalatórios, eles foram expostos ao aerossol de salina normal 0,9% durante 30 minutos por dia. Esse grupo controle foi idealizado com o objetivo de reduzir, no estudo, o viés da indução da inflamação apenas pelo fato dos animais receberem inalações diárias, além de ser o controle da permanência prolongada dos animais no biotério de manutenção.

4.5. PREPARAÇÃO DO ANIMAL

Todos os procedimentos de avaliação do processo inflamatório e da mecânica pulmonar foram realizados quarenta e oito horas (48 horas) após o último desafio antigênico e/ou tratamento com salbutamol. Tal tempo foi escolhido por apresentar a melhor resposta inflamatória, como observado na literatura (Tomkinson *et al.*, 2001) e comparado com os experimentos pilotos.

Os animais submetidos aos procedimentos invasivos foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de pentobarbital sódico 70mg/kg (Cristália Ltda., São Paulo, Brasil). A via aérea foi canulada com um catéter intravascular de tamanho G20 (gauge 20). Para a coleta de lavado broncoalveolar (BAL) e dos pulmões para análise histopatológica, o animal anestesiado foi sacrificado por exsanguinação mediante injeção de 0,1ml de heparina 5000UI e secção da aorta abdominal, após laparotomia.

4.6. LAVADO BRONCOALVEOLAR

O animal ainda anestesiado foi sacrificado por secção da aorta abdominal após a injeção de 0,1ml de heparina 5000UI e então, inseriu-se uma torneira de três vias na cânula da traqueostomia. Utilizou-se 1,5ml de PBS para a coleta do lavado bronco-alveolar (BAL), dividido em três alíquotas. O material obtido foi mantido na geladeira, até o processamento, que consistiu

na contagem total de células com o hemocitômetro de Neubauer e na centrifugação do BAL com a transferência do sobrenadante (BALF) para um outro tubo cônico, que foi armazenado a -70°C para posterior análise de citocinas. O botão celular foi ressuspenso com 200 μl de PBS pH=7,4 e processado em uma citocentrífuga para obtenção de lâminas desse material, que foi corado com coloração tipo panótico Hemacolor constituída de Hematoxilina - Eosina (Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil).

A contagem diferencial das células foi determinada a partir do achado de pelo menos 200 leucócitos/lâmina e a diferenciação seguiu os critérios hemocitológicos para diferenciação de neutrófilo, eosinófilo, linfócitos e macrófagos.

4.7. COLETA DE PULMÕES E HISTOPATOLOGIA

Os pulmões foram insuflados com 0,2ml de ar e a traquéia ocluída, procedendo-se com a retirada dos mesmos em monobloco. O material foi inserido em um tubo de plástico contendo paraformaldeído a 4% tamponado, com pH 7,4 e fixado durante 18 a 24 horas à temperatura ambiente, sendo imediatamente transferido e armazenado em álcool 70%. Os pulmões foram cortados em secções transversais e longitudinais em relação ao hilo, e submetidos à técnica tradicional de histologia para a obtenção do material embocado em parafina, obtendo-se lâminas com espessura de 5 a 6 μm e corados com Hematoxilina e Eosina.

Foi quantificado o número de leucócitos linfomononucleares (LMN) – composto em grande parte por linfócitos - nas vias aéreas e no parênquima pulmonar das lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Para tal foi utilizada a técnica morfométrica de contagem de pontos com auxílio de um retículo de 100 pontos e 50 retas acoplado à ocular do microscópio óptico, no aumento de 1000x. Foram aleatoriamente escolhidas três vias aéreas por lâmina e a quantificação foi feita no maior número de campos possíveis, que circundassem a parede brônquica, evitando-se as áreas próximas de vaso e de tecido linfocitário brônquico (BALT) (Tibério *et al.*, 1997; Kasahara, 2001; Leick-Maldonado, 2002; Leick-Maldonado *et al.*, 2004).

No parênquima pulmonar, as células LMN e PMN no septo alveolar foram quantificadas e a área estudada foi determinada pela contagem do número de pontos do retículo utilizado que se sobrepõem ao septo alveolar. A inflamação do parênquima de cada lâmina de pulmão de camundongos foi avaliada em 10 campos escolhidos aleatoriamente. Para as observações utilizou-se um microscópio óptico em aumento de 1000 vezes (Tibério *et al.*, 1997; Kasahara, 2001; Leick-Maldonado, 2002; Leick-Maldonado *et al.*, 2004).

4.8. CITOQUÍMICA PARA EOSINÓFILOS EPO+

Os pulmões, após serem removidos em monobloco, foram insuflados com solução de congelamento de tecidos diluída com salina normal 2:1 vol/vol (Jung Tissue Freezing Medium, Leica Instruments GmbH, Alemanha) por meio de canulação das vias aéreas. Cortou-se os fragmentos de tecido pulmonar em secções transversais no pulmão direito e cortes longitudinais em relação ao hilo no pulmão esquerdo. Os fragmentos foram então embebidos com a solução de congelamento, embrulhados em papel alumínio com a sua respectiva identificação, congelado por imersão em nitrogênio líquido e armazenados em um freezer a -70°C (Leick-Maldonado, 2002; Leick-Maldonado *et al.*, 2004).

Posteriormente, os fragmentos foram cortados com o auxílio de um criostato (Leica Instruments GmbH, Alemanha), obtendo-se preparações com $3\mu\text{m}$ de espessura, que foram colocados sobre lâminas de vidro previamente limpas e pré-tratadas com poli-L-lisina, fixadas em clorofórmio-acetona 1:1 vol/vol durante 10 minutos e as lâminas secas em ar ambiente durante 20 minutos (Leick-Maldonado, 2002; Leick-Maldonado *et al.*, 2004).

Os preparados foram mantidos durante 10 minutos em contato com solução de Na_2PO_4 (60mM) e KH_2PO_4 (70mM) em pH 7,5, KCN, diamino-benzidina e H_2O_2 . Posteriormente, as células foram contra-coradas com hematoxilina. As células positivas coradas em marrom-dourado foram

denominadas células eosinofílicas EPO+ (EPO: Peroxidase eosinofílica). Por utilizar o cianeto de potássio (KCN), a reação é específica à peroxidase eosinofílica, não marcando as outras células sensíveis ao cianeto como os neutrófilos (Zucker-Franklin & Grusky, 1976; Ten *et al.*, 1989; Lapa e Silva *et al.*, 1993; Leick-Maldonado *et al.*, 2004).

A contagem das células eosinofílicas EPO+ seguiu a mesma técnica descrita para o estudo das células linfomononucleares (LMN) no tecido corado com hematoxilina-eosina. Quantificamos em ambos os compartimentos pulmonares: parede de vias aéreas e no parênquima pulmonar.

4.9. ANAFILAXIA CUTÂNEA PASSIVA PARA IgE

A análise semi-quantitativa do anticorpo IgE específica a OVA foi realizada pela técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA – Passive Cutaneous Anaphylaxis), seguindo o protocolo já descrito na literatura (Ovary, 1964; Mota & Wang, 1969; Mota & Perini, 1970; Warth *et al.*, 1995;). No décimo quarto dia após o último desafio antigênico e/ou procedimento de tratamento com salbutamol, coletamos com o auxílio de uma pipeta de vidro previamente heparinizada o sangue dos camundongos por meio de sangria total, após secção da artéria braquial esquerda. Seguiu-se a obtenção dos

soros por meio de centrifugação a 1500 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada, armazenados em freezer a -70°C até o momento da análise.

A quantificação de anticorpos IgE específica à OVA foi realizada pela técnica de anafilaxia cutânea passiva, onde injetou-se as diluições seriadas das amostras no subcutâneo da região dorsal previamente depilada de ratos Wistar (peso entre 200 e 250g). Após um período de 18 a 24 horas, os ratos foram desafiados com uma solução de OVA 1mg/ml em Azul de Evans a 0,25%, por meio de injeção intra-venosa na veia caudal. O protocolo foi realizado em duplicata para minimizar os efeitos da variação de respostas dos receptores de IgE em mastócitos.

Após o desafio intra-venoso, esperou-se entre 30 minutos a uma hora, onde os ratos foram sacrificados com injeção intra-peritoneal de pentobarbital sódico 70mg/kg e a pele do dorso foi invertida para medida da maior diluição do soro capaz de provocar extravasamento do corante. Considerou-se resposta positiva a formação de um círculo azulado, derivado do extravasamento vascular, com diâmetro mínimo de 2mm.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por utilizar uma linhagem isogênica de camundongos, espera-se uma resposta relativamente homogênea, dessa forma os dados teriam um comportamento que segue a curva normal gaussiana, o que foi observado na grande maioria dos dados coletados. Entretanto, certos procedimentos como a determinação de padrão inflamatório, apresentam como fator de erro o uso do olho humano para a quantificação. Dessa forma, apresentaremos alguns resultados que não passaram no teste de Kolmogorov-Smirnov (distância K-S), na forma de box-plot. Para os demais utilizamos a representação gráfica de barras com respectivo erro padrão da média.

Para a análise estatística utilizamos a Análise de Variância e as comparações múltiplas foram feitas com o teste de Bonferroni para os dados que apresentaram um comportamento normal no teste de Kolmogorov-Smirnov e que passaram também no teste de Igualdade de Variância. Para os demais, foi utilizada a Análise de Variância pelo método de Kruskal-Wallis. Consideramos uma probabilidade de diferença significativa o valor menor que cinco por cento ($p < 0,05$).

Para a análise estatística utilizou-se o programa de computador Sigma-Stat 2.0 e os gráficos foram elaborados por auxílio do programa Sigma-Plot 4.0, ambos da SPSS Ltd., EUA.

Resultados

The image features a decorative graphic on the right side consisting of three vertical lines of varying thicknesses. From left to right, there is a thin line, a medium-thickness line, and a thick line. These lines extend from the top of the page down to the level of the 'Resultados' text.

5.1. DEFINIÇÃO DO MODELO A SER UTILIZADO

O modelo a ser desenvolvido implicava na necessidade da manutenção da inflamação por pelo menos quatro semanas, o que se conseguiu neste estudo. Para a obtenção do modelo, utilizamos como parâmetro de avaliação da inflamação o lavado bronco-alveolar. O primeiro piloto, que consistiu na tentativa de sensibilização intra-muscular com 50 μ g de OVA associada a 6mg de Al(OH)₃, onde, após quatorze dias foram administrados cinco desafio inalatórios em dias consecutivos de OVA 1% por 20 minutos, não obtivemos êxito, ou seja, não houve uma eosinofilia significativa eosinofilia, quando comparado com o grupo controle.

Na seqüência, optou-se por utilizar o protocolo de Siqueira et al., no qual o animal é inicialmente sensibilizado via intraperitoneal (OVA 50 μ g + Al(OH)₃ 1mg) e repetido após doze dias. Procede-se a três desafios inalatórios com OVA 1% ou salina 0,9% diários da seguinte forma: 30 minutos de exposição com 30 minutos de intervalo, nos dias 24, 26, 28 e 30. Observou-se neste protocolo, aumento expressivo de eosinófilos e neutrófilos 48 horas após o último desafio.

Obtido o processo inflamatório com características celulares similares ao que se observa em processos alergênicos, decidiu-se desafiar os camundongos com OVA 1% em dias alternados até o dia 58. Sem a adição

de desafios intraperitoniais nos dias 32 e 46, o processo inflamatório retroage até valores semelhantes ao grupo controle salina, entretanto as injeções adicionais permitiram a manutenção do *status* inflamatório desejado, atingindo resultados satisfatórios para prosseguir com o estudo.

O custo do projeto seria muito elevado com a utilização de ovoalbumina de procedência Sigma-Aldrich. Dessa forma, um novo piloto foi realizado, reduzindo-se os três desafios diários, para um único desafio de 1% de OVA, e comparou-se a OVA de procedência estrangeira (Sigma-Aldrich grau III) com a OVA bruta e liofilizada de procedência nacional (Advanced Nutrition, Rio de Janeiro, Brasil). Ambos os antígenos produziram níveis elevados de eosinófilos e neutrófilos comparado com o grupo controle, e o aumento de linfócitos foi observado apenas na OVA estrangeira de alto grau de pureza. Assim, chegou-se ao modelo de um único desafio de OVA de procedência nacional a 1% em dias alternados e com desafios intraperitoniais adicionais nos dias 32 e 46. A OVA de procedência importada (Sigma) apresentou valor de contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar menor que o grupo de animais sensibilizados e desafiados com OVA de procedência nacional, entretanto ambas foram significativamente maior que o grupo salina (mediana: $1,85 \cdot 10^6$ vs. $1,09 \cdot 10^6$ vs. $1,04 \cdot 10^5$ células/mL respectivamente, $p < 0,05$), além disso, observamos aumento de eosinofilia em ambas as ovoalbuminas utilizadas (sigma: 7% e nacional: 4,5% vs controle: 0%). Quanto aos custos, para um grupo de 20 camundongos, enquanto a OVA de procedência importada deve ser gasto R\$ 1.200,00, o

de procedência nacional o mesmo protocolo custa R\$ 0,60 (Kasahara et al., 2002).

Os resultados descritos nas seções seguintes baseiam-se no último modelo descrito, comparando os grupos SAL (controle salina), OVA (animais sensibilizados e desafiados com ovoalbumina), OVA+IS (grupo OVA tratado com salbutamol a cada 96 horas, simulando um uso intermitente do broncodilatador) e OVA+DS (grupo OVA tratado com salbutamol diário, simulando o uso diário de broncodilatador).

5.2. LAVADO BRONCO-ALVEOLAR

O nosso protocolo de inflamação produziu aumentos significativos da contagem total de leucócitos no lavado bronco-alveolar no grupo sensibilizado com OVA, como pode ser observada na figura 2, comparado com o grupo controle NS ($7,5 \pm 2,6$ versus $0,9 \pm 0,4$; $\times 10^5$ leucócitos. ml^{-1} , $p < 0,001$). O tratamento diário (OVA+DS) com salbutamol reduziu significativamente o número total de leucócitos comparado com o grupo OVA ($3,4 \pm 1,8 \times 10^5$ leucócitos. ml^{-1} , $p < 0,001$). Não foi observada redução significativa do número total de leucócitos do grupo OVA após tratamento com salbutamol intermitente, ou seja, tratados a intervalos de 96 horas ($4,8 \pm 3,1 \times 10^5$ leucócitos. ml^{-1} , $p = 0,155$).

Após a contagem diferencial dos leucócitos nas lâminas de lavado broncoalveolar, os dados foram corrigidos para serem expressos em células por volume de lavado broncoalveolar recuperado, multiplicando-se os percentuais de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos com os valores de leucócitos totais, em cada animal estudado.

Na quantificação de macrófagos recuperados, observamos aumento no grupo OVA comparado com o grupo NS ($2,5 \pm 1,3$ versus $0,7 \pm 0,3$; $\times 10^5$ macrófagos. ml^{-1} , $p=0,014$). Não se observou queda significativa de macrófagos após tratamento com salbutamol intermitente (OVA+IS) ou diário (OVA+DS), respectivamente: $1,8 \pm 0,8 \times 10^5$ macrófagos. ml^{-1} e $2,9 \pm 1,4 \times 10^5$ macrófagos. ml^{-1} , como se pode observar na figura 3.

A figura 4 representa os dados de quantificação de linfócitos no lavado broncoalveolar. Aqui também, somente o grupo OVA apresentou aumento significativo de linfócitos, comparado com o grupo NS ($9,2 \pm 7,4$ versus $1,3 \pm 0,9 \times 10^4$ linfócitos. ml^{-1} , $p=0,035$), enquanto que ambos os tratamentos com salbutamol não mostraram modificação da contagem de linfócitos (OVA+IS e OVA+DS, respectivamente $5,5 \pm 5,6$; $\times 10^4$ linfócitos. ml^{-1} e $2,8 \pm 2,5$; $\times 10^4$ linfócitos. ml^{-1}).

Quanto aos neutrófilos, o modelo de inflamação obtido apresentou aumento do número de neutrófilos, onde o grupo OVA apresentou valores maiores que o grupo controle ($15,8 \pm 12,4$ versus $6,0 \pm 5,8$; $\times 10^4$

neutrófilos.ml⁻¹, P=0,002). Podemos observar na figura 5 que ambos os tratamentos, OVA+IS (regime intermitente) e OVA+DS (regime regular) apresentaram valores de neutrófilos significativamente inferiores ao do grupo OVA [(OVA+IS versus OVA: $3,5 \pm 3,7 \times 10^4$ versus $15,8 \pm 12,4 \times 10^4$ neutrófilos.ml⁻¹, p=0,01) e (OVA+DS versus OVA: $2,6 \pm 2,6 \times 10^4$ versus $15,8 \pm 12,4 \times 10^4$ neutrófilos.ml⁻¹, p=0,008), indicando a capacidade do salbutamol, independentemente do regime empregado, em influenciar no recrutamento de neutrófilos para o lúmen da via aérea.

Além disso, o modelo apresentado mostra aumento significativo de eosinófilos para os animais do grupo OVA quando comparados com aqueles do grupo salina NS: $248,0 \pm 165,4 \times 10^3$ versus $2,6 \pm 1,9 \times 10^3$ eosinófilos.ml⁻¹, p<0,05. Após a indução da inflamação, somente o tratamento diário com salbutamol mostrou reduzir o recrutamento de eosinófilos ao compartimento mensurado pelo lavado broncoalveolar ($13,9 \pm 6,3 \times 10^3$ eosinófilos.ml⁻¹, p<0,05), sugerindo uma enquanto que o tratamento com salbutamol no regime intermitente (inalação a cada 96 horas) não apresentou redução significativa, como podemos observar na figura 6.

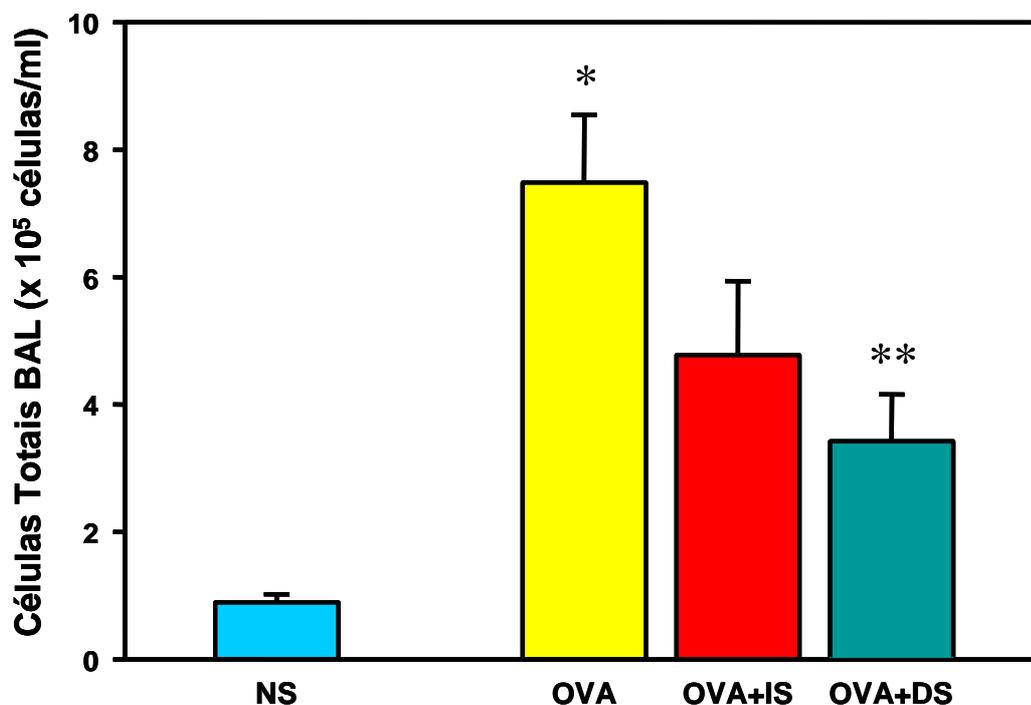
Quantificação de Número de Leucócito Total no Lavado Broncoalveolar

Figura 2. Número total de células leucocitárias recuperadas no lavado broncoalveolar. * $p < 0,001$ comparado com grupo salina (NS). ** $p = 0,021$ comparado com o grupo OVA. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

O grupo de animais expostos a OVA, de acordo com o protocolo realizado, apresentou expressiva e significativa elevação do número de leucócitos no “BAL”. O tratamento com salbutamol reduziu a contagem, que foi significativa no grupo OVA+DS.

Quantificação de Macrófagos no Lavado Broncoalveolar

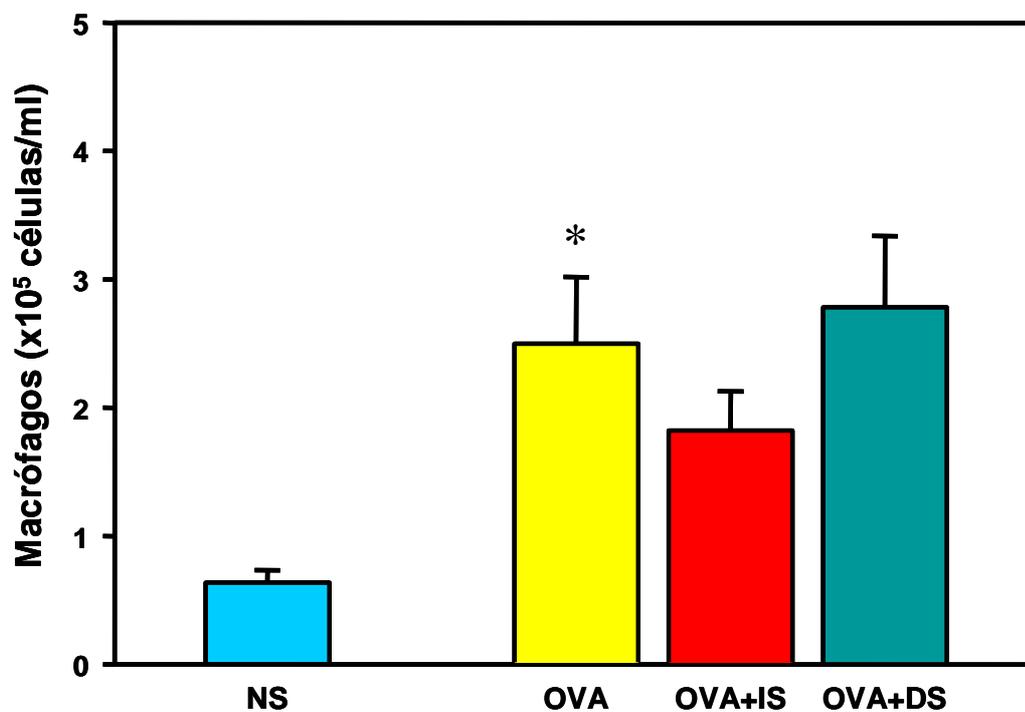


Figura 3. Número de macrófagos recuperado no lavado broncoalveolar.

* $p=0,014$ comparado com controle NS. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

A contagem de macrófagos é estatisticamente superior no grupo OVA, comparado a NS. Houve aumento proporcional de macrófagos no grupo OVA+DS, embora sem significado estatístico.

Quantificação de Linfócitos no Lavado Broncoalveolar

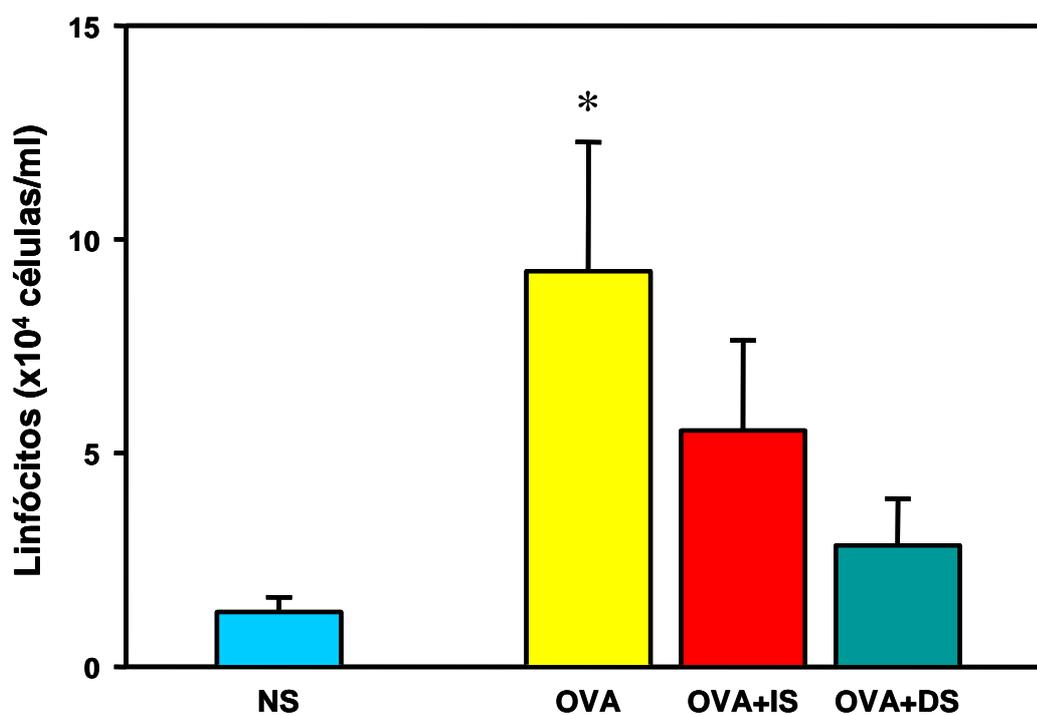


Figura 4. Linfócitos quantificados no lavado broncoalveolar. * $p=0,035$ comparado com controle NS. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

A exposição à OVA elevou significativamente o número de linfócitos à BAL dos animais expostos à OVA. O tratamento com salbutamol reduziu estes valores embora sem que haja diferença significativa.

Quantificação de Neutrófilos no Lavado Broncoalveolar

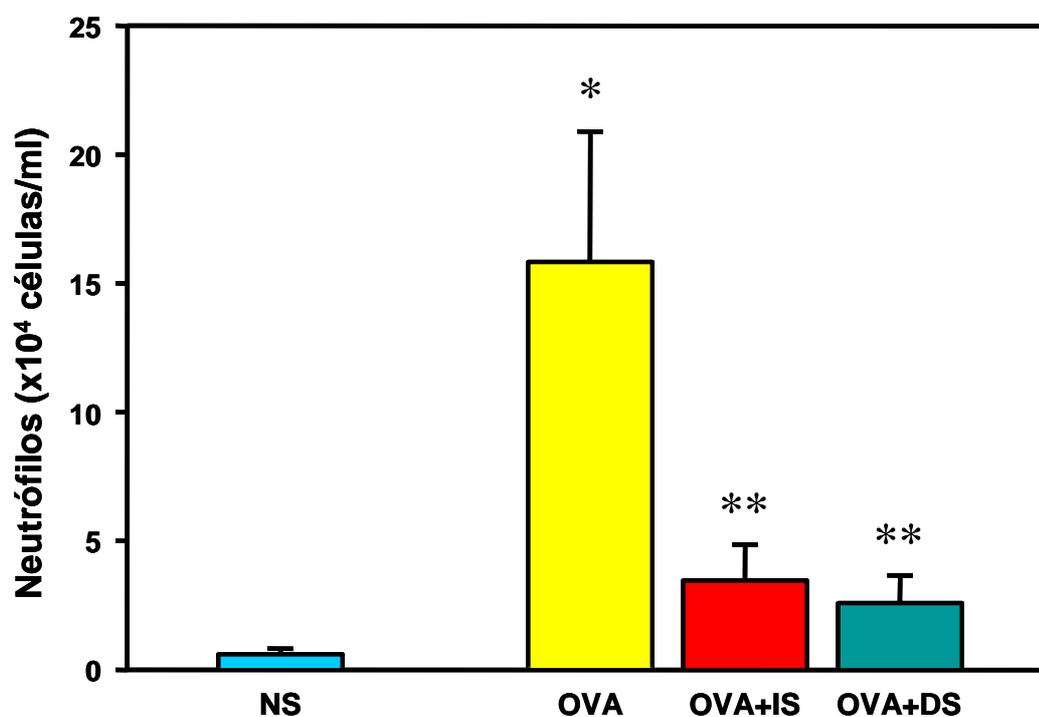


Figura 5. Neutrófilos quantificados no lavado broncoalveolar. * $p < 0,02$ comparado com controle NS. ** $p = 0,010$ comparado com o grupo OVA. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

O número de neutrófilos é significativamente maior no BAL de animais submetidos à OVA. Ocorreu redução estatisticamente intensa nos grupos expostos à OVA e tratadas com salbutamol, independentemente do regime empregado.

Quantificação de Eosinófilos no Lavado Broncoalveolar

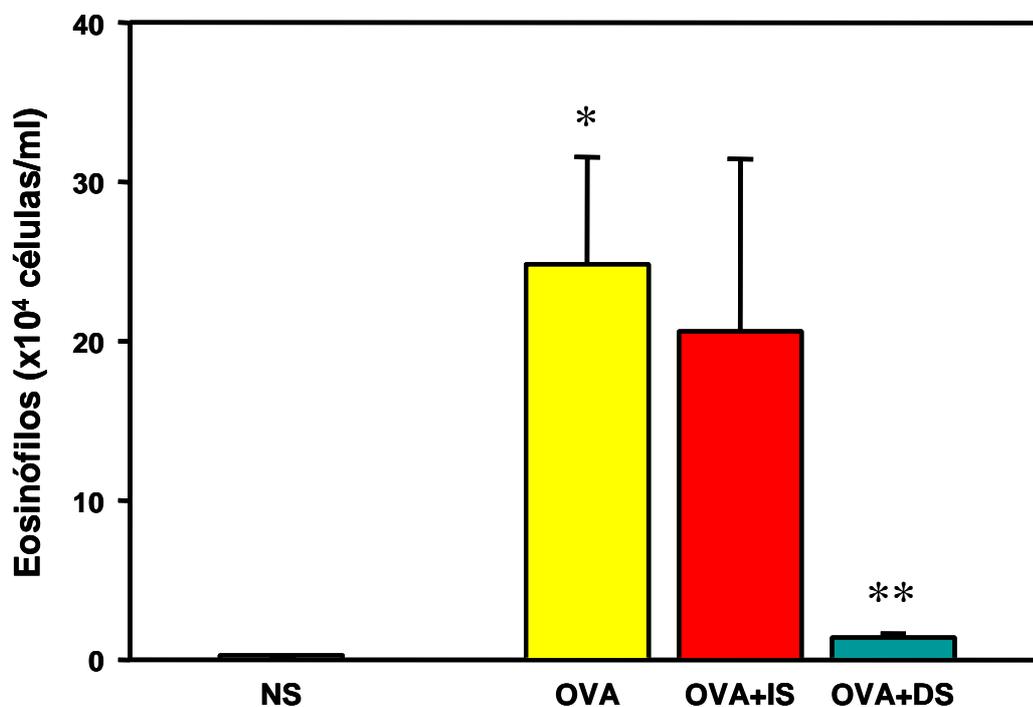


Figura 6. Eosinófilos quantificados no lavado broncoalveolar. * $p < 0,01$ comparado com controle NS. ** $p < 0,01$ comparado com o grupo OVA. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

Ocorreu incremento no número de eosinófilos recuperados do BAL do grupo OVA. O tratamento com salbutamol reduziu este contingente celular, que ocorreu de modo significativo e expressivo nos animais que receberam inalações diárias de β_2 -agonista.

5.3. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

No estudo de histopatologia, quantificamos as células linfomononucleares (LMN) na parede de vias aéreas e no septo alveolar, junto com as respectivas áreas de tecido, por meio da contagem de pontos. Os valores apresentados foram calculados, dividindo-se o número de células sobre a área obtida, corrigida para uma mesma quantidade de área ($10^4 \mu\text{m}^2$) equivalente à contida no interior de um retículo no aumento de 1000x. As células linfomononucleares observadas foram essencialmente compostas de linfócitos e macrófagos alveolares.

Na parede de vias aéreas, parede peribrônquica, observamos maior quantidade de células LMN nos animais OVA, comparados com o grupo controle, como podemos observar na figura 7 ($3,8 \pm 1,6$ versus $0,4 \pm 0,6$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$, $p=0,006$). Ambos os tratamentos com salbutamol não apresentaram redução de células LMN peribrônquicos: OVA+IS e OVA+DS apresentaram respectivamente $4,1 \pm 1,9$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ e $3,9 \pm 2,5$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$ ($p=0,998$ e $p=1$, respectivamente comparado com o grupo OVA).

A figura 8 apresenta os dados da quantificação das células linfomononucleares no septo alveolar dos quatro grupos estudados. Os animais OVA apresentaram maiores valores de LMN, comparados com os animais do grupo controle: OVA vs NS – $9,9 \pm 2,2$ versus $2,8 \pm 2,5$

células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p=0,003$. Apenas o tratamento intermitente com salbutamol foi capaz de atenuar a resposta linfomononuclear da inflamação induzida por ovoalbumina ($6,5\pm 1,5$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p=0,016$; comparado com o grupo OVA) enquanto que o tratamento diário apresentou valores semelhantes aos observados nos animais OVA ($9,4\pm 1,3$ células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $p=0,971$ comparado com OVA).

Quantificação de Células LMN na Parede Peribrônquica

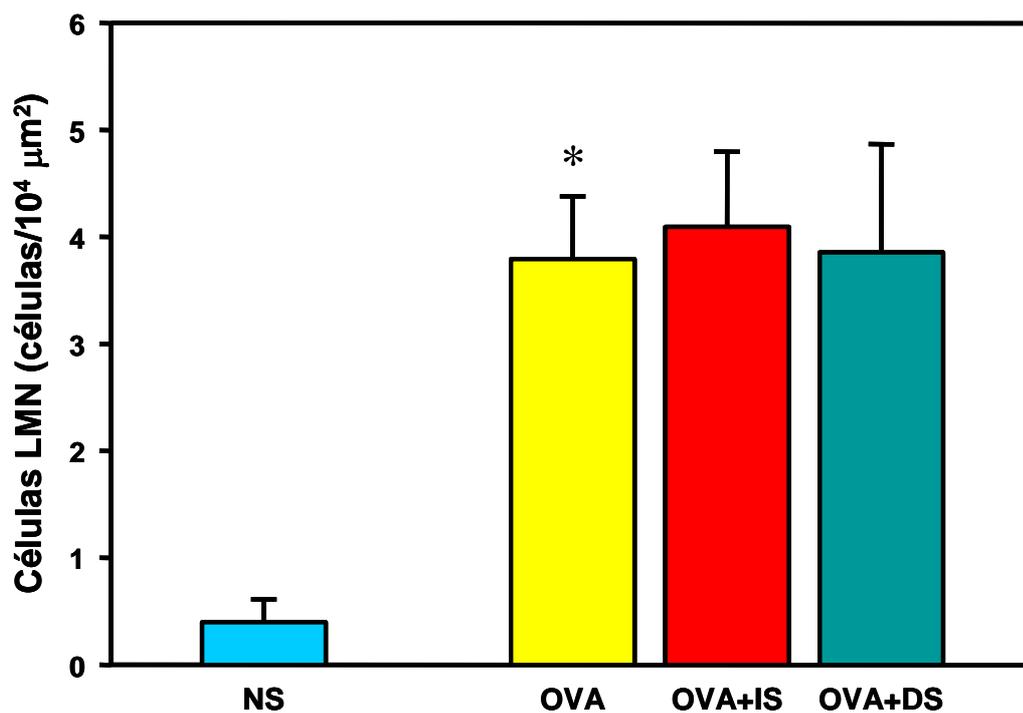


Figura 7. Número de células linfomononucleares quantificados na **parede de vias aéreas** por morfometria. * $p < 0,006$ comparado com o grupo salina. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

O infiltrado de LMN das paredes brônquicas dos animais expostos à OVA foi significativamente superior à aqueles dos animais controle (salina). O tratamento com salbutamol não afetou esta resposta.

Quantificação de Células LMN no Parênquima Pulmonar

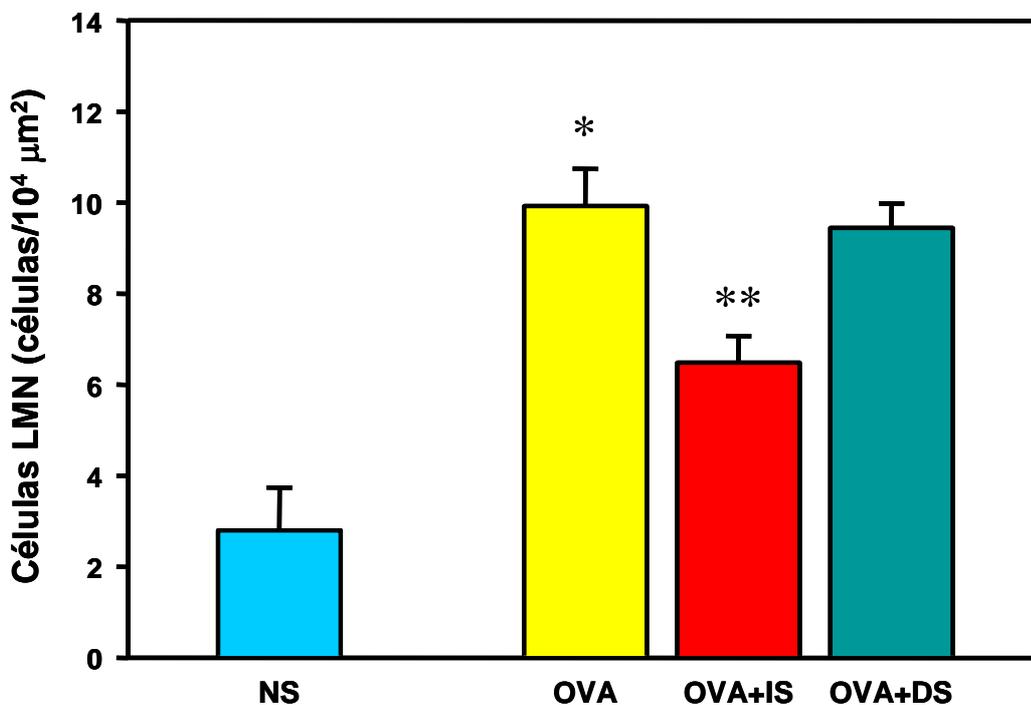


Figura 8. Número de células linfomononucleares quantificados nos **Septos alveolares** por morfometria. * $p < 0,001$ comparado com o grupo NS. ** $p = 0,016$ comparado com o grupo OVA. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

O infiltrado de LMN nos septos alveolares foi expressivamente maior para o grupo de animais expostos ao antígeno (OVA) em comparação aos controles (NS). O tratamento com salbutamol provocou redução significativa do infiltrado inflamatório para os animais expostos à OVA e que receberam β 2-agonista a intervalos de 96 horas (OVA+IS).

5.4. CITOQUÍMICA PARA EOSINÓFILOS EPO+

O número de eosinófilos EPO+ cianeto resistentes foram quantificados tanto na parede peribrônquica quanto no septo alveolar. Observamos que o modelo de inflamação pulmonar em camundongos desenvolvido mostrou positividade para EPO em ambos os compartimentos, mesmo após mais de 30 dias de exposição à ovoalbumina.

Na parede peribrônquica (figura 10) houve aumento significativo de células EPO+ no grupo OVA, comparado com o grupo controle NS. Os animais tratados com salbutamol não apresentaram redução estatisticamente significativo, apesar de mostrarem tendência para menor expressão de eosinófilos EPO+, comparados com os animais OVA, como podemos observar na figura 9. OVA versus NS: $4,2 \pm 1,9$ versus $0,2 \pm 0,3$ eosinófilos EPO+/10⁴μm², $p < 0,001$. Grupos OVA+IS e OVA DS apresentam os seguintes valores respectivamente: $1,9 \pm 0,8$ e $3,2 \pm 1,6$ células EPO+/10⁴μm².

A quantificação de eosinófilos EPO+ no septo alveolar mostrou-se elevado no grupo OVA em relação ao grupo NS ($3,2 \pm 0,9$ versus $0,7 \pm 0,5$ células EPO+/10⁴μm², $p < 0,001$), enquanto que ambos os tratamentos com salbutamol apresentaram efeito modulador do recrutamento de eosinófilos para o septo alveolar, que se reduziu significativamente, comparado com o grupo OVA como podemos observar na figura 11 [OVA+IS e OVA+DS:

1,4±0,9 (p=0,003) e 1,9±0,4 (p=0,043) células EPO+/10⁴µm²,
respectivamente].

Quantificação de Células EPO+ na Parede Peribrônquica

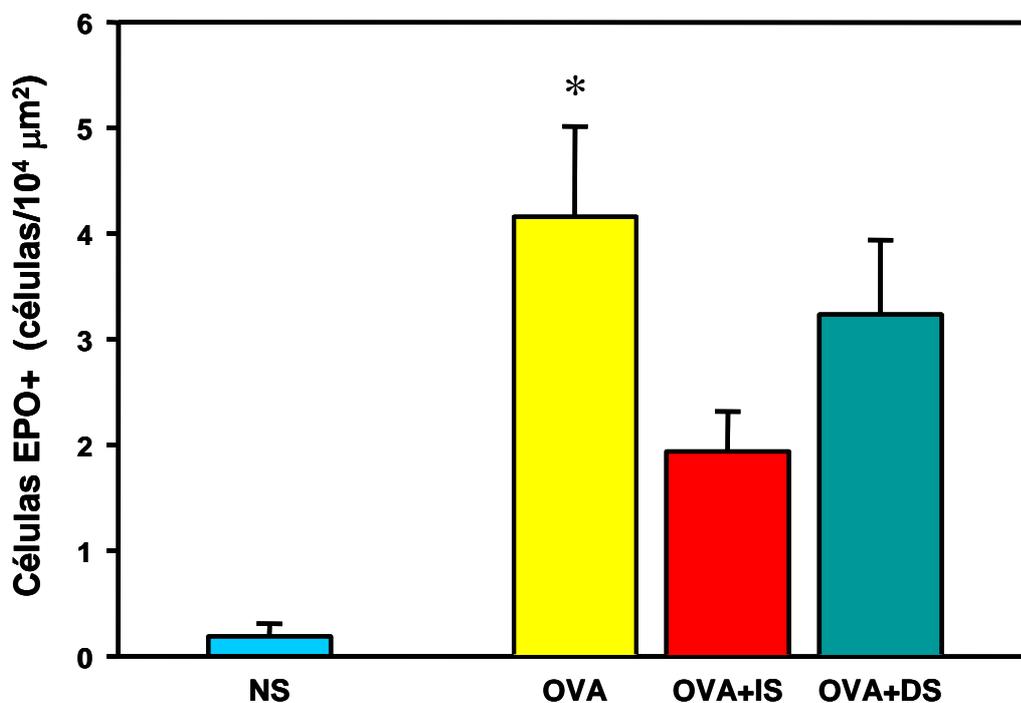


Figura 9. Número de eosinófilos EPO+ quantificados na **parede de vias aéreas** por morfometria. * $p < 0,001$ comparado com o grupo NS. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

A inalação com OVA provocou aumento significativo na expressão de células EPO+ na parede de vias aéreas. O tratamento com β_2 -agonista reduziu, de forma não significativa, esta expressão, que foi maior nos animais tratados com salbutamol diariamente.

Quantificação de Células EPO+ no Parênquima Pulmonar

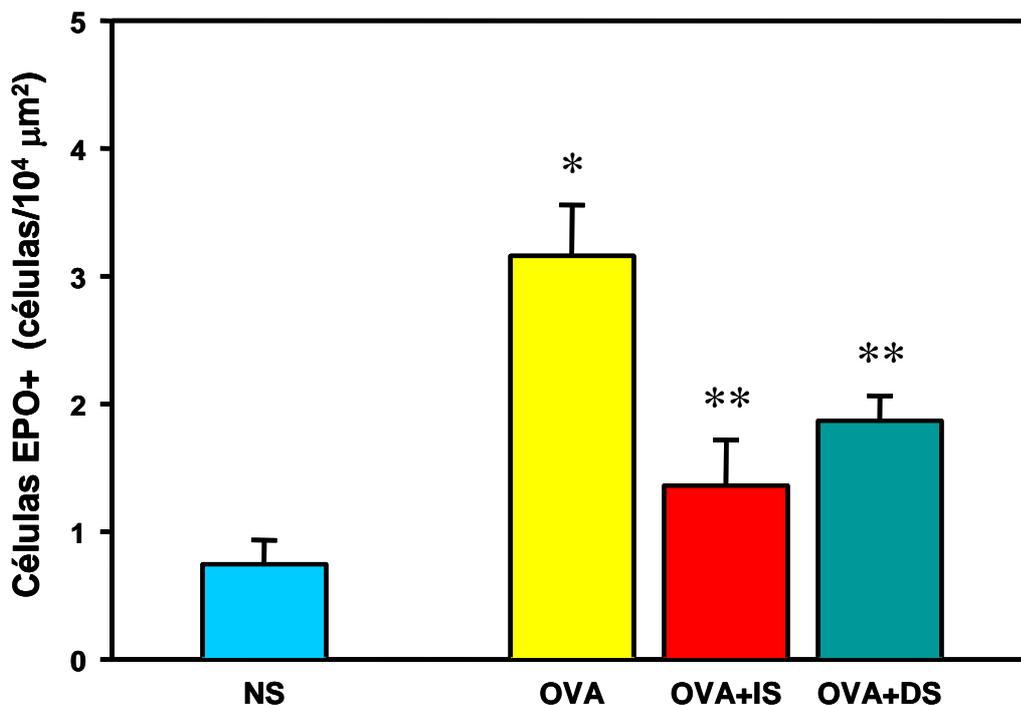


Figura 10. Número de eosinófilos EPO+ quantificados na **parede alveolar** por morfometria. * $p=0,003$ comparado com o grupo NS. ** $p=0,043$ comparado com o grupo OVA. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

A positividade de células EPO+ foi significativamente maior no parênquima pulmonar do grupo sensibilizado com OVA. O tratamento com salbutamol reduziu significativamente esta expressão, independentemente do tipo de regime de salbutamol proposto.

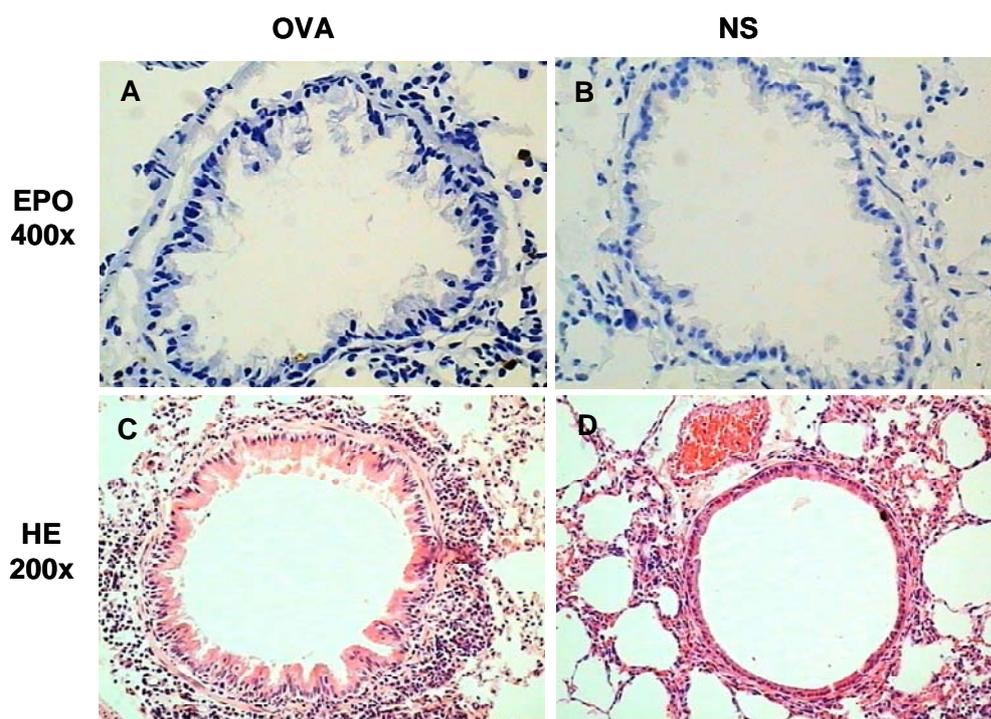


Figura 11. Fotomicrografia mostrando corte transversal de vias aéreas. Os painéis A e C representam os animais OVA, enquanto que os controles, tratados apenas com salina, estão representados em B e D. As figura A e B são lâminas coradas para eosinófilos EPO+ cianeto resistentes e as figuras C e D são corados com hematoxilina e eosina. Observamos uma grande quantidade de eosinófilos na figura A comparado com a C e há um grande infiltrado inflamatório em C comparado com D que mostra um bronquíolo normal de camundongo Balb/c.

Os painéis A e B mostram a expressão de células EPO+ para o grupo sensibilizado com OVA e controle, respectivamente. Enquanto que os painéis C e D são amostras coradas para hematoxilina-eosina. Observa-se menos infiltrado inflamatório celular para os animais salina. O grupo OVA mostra um maior infiltrado, e maior expressão de células EPO+.

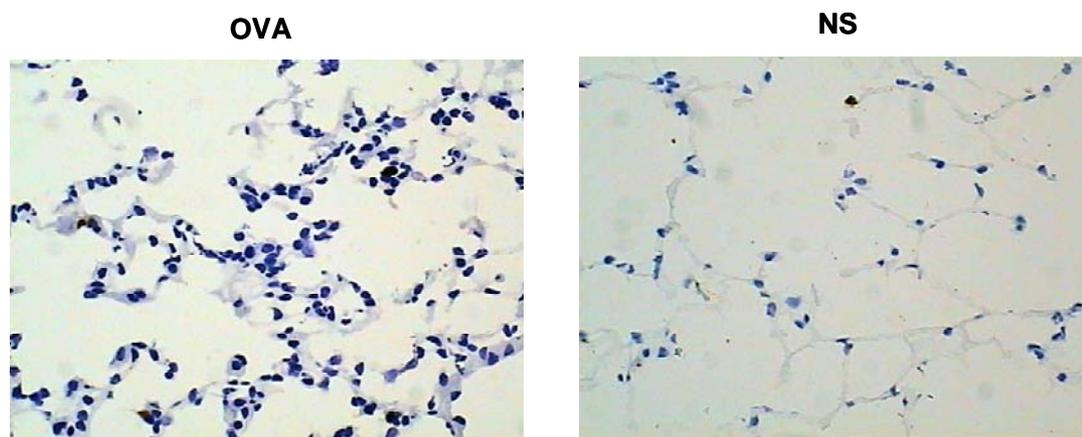


Figura 12. Fotomicrografia representativa de alvéolo de um animal inflamado com OVA (esquerda) e de um animal submetido apenas a tratamento com salina normal (direita). A coloração utilizada nessas micrografias foram para eosinófilos EPO+ resistentes ao cianeto. Observa-se maior densidade celular e expressão de células EPO+ nos animais submetidos à sensibilização com OVA. O aumento utilizado para ambas as fotografias fora de 400x.

5.5. PCA PARA IGE ESPECÍFICA À OVA

No teste de anafilaxia cutânea passiva, quantificamos a imunoglobulina IgE específica para ovoalbumina, por meio da degranulação de mastócitos de um animal não sensibilizado. Observamos títulos elevados de IgE nos animais dos grupos **OVA**, **OVA+IS** e **OVA+DS**. Os animais controles (NS) não apresentaram reação de degranulação e formação de edema, observado pelo extravasamento do Azul de Evans. Entre os grupos tratamento e o grupo **OVA**, não conseguimos detectar diferenças na produção de IgE (figura 13). O título máximo de IgE nos três grupos: OVA, OVA+IS e OVA+DS foi 1:160. Os menores títulos de IgE foram obtidos no grupo OVA+IS, com valores entre 1:20 até 1:160. O grupo OVA+DS apresentou títulos entre 1:40 a 1:160.

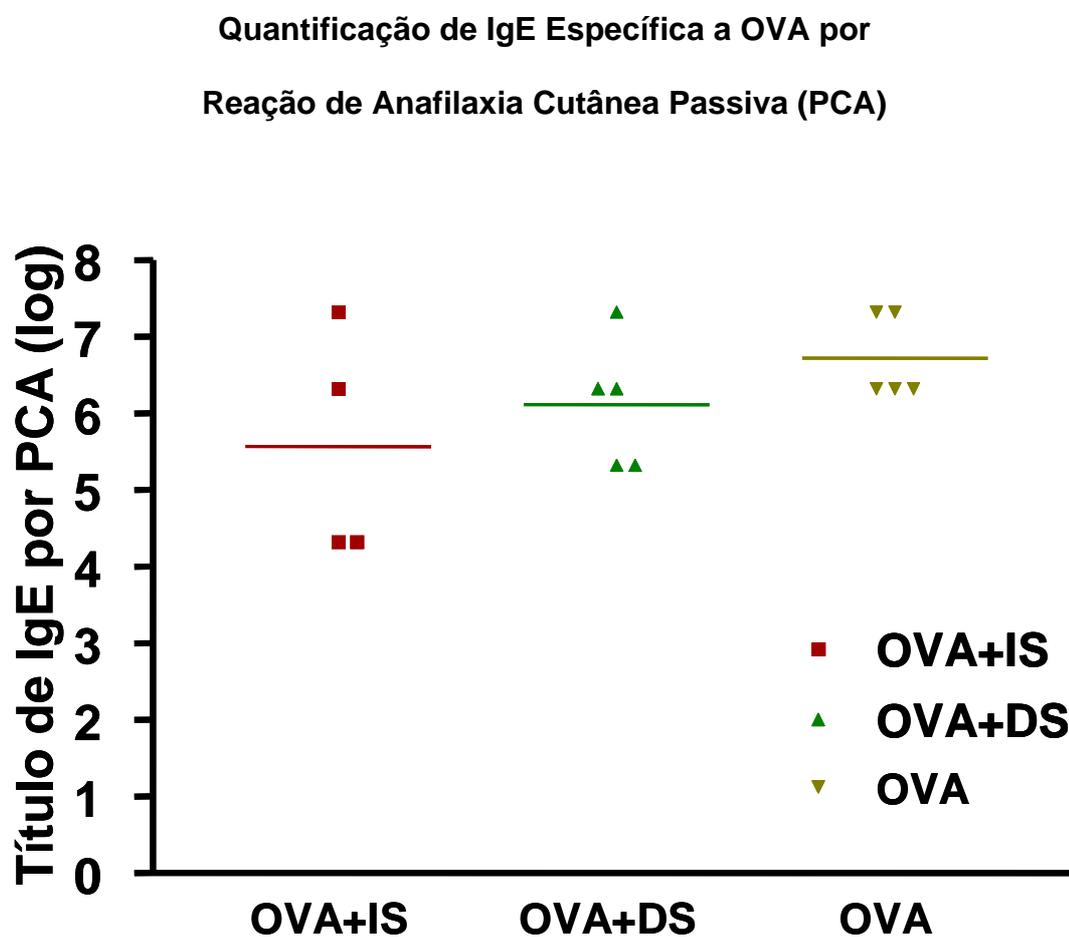


Figura 13. Log decimal do título de IgE obtida por meio da reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados OVA, OVA+IS e OVA+DS. O grupo controle, que não está apresentado na figura, apresentou reação negativa. Os grupos são: NS – salina normal, OVA – inflamado com ovoalbumina, OVA+IS – inflamado com OVA e tratado com salbutamol a cada 96 horas, e OVA+DS – inflamado e tratado com salbutamol diário.

Discussão



O modelo desenvolvido no presente estudo apresentou correlação fisiopatológica com a doença estudada, a asma, onde há a presença de infiltrado inflamatório eosinofílico no lavado broncoalveolar, nas vias aéreas e no parênquima pulmonar. Além disso, observamos um grande fluxo de neutrófilos no modelo estudado, possivelmente pela característica crônica da inflamação desenvolvida.

Os dados obtidos no modelo em discussão se aproximam daqueles observados no estudo denominado ENFUMOSA, no qual se estudou as características inflamatórias de pacientes asmáticos persistentes graves, foi observado, no escarro induzido, a presença de eosinófilos como já era esperado, e de grande número de neutrófilos (ENFUMOSA, 2003).

Vários protocolos de inflamação pulmonar induzida por OVA apresentados na literatura não são modelos crônicos, como são denominados. Quase todos os modelos são obtidos após duas injeções intra-peritoneais de ovoalbumina adsorvida em hidróxido de alumínio, com intervalo de 12 a 14 dias. Após o período de sensibilização, segue-se um repouso de 12 a 14 dias e há desafios inalatórios ou intra-nasais de solução de ovoalbumina. Geralmente, variam entre um único a até sete desafios consecutivos. Existem poucos modelos descritos que estendam o desafio a período superior a trinta dias.

Desafios mantidos por períodos superiores a 30 dias proporcionam, com maior probabilidade, alterações estruturais semelhantes às aquelas denominadas de remodelamento nos portadores de asma. Além disso, injeções intraperitoneais exclusivas de antígeno não garantem a inflamação pulmonar com predomínio de eosinófilos, motivando pesquisadores a buscarem desenvolver modelos, como o de implante subcutâneo de ovalbumina, nesta espécie animal, para tal objetivo (Russo *et al.*, 1998).

O esforço na direção da obtenção de modelos assim desenvolvidos vem no sentido de permitir maior aproximação com os eventos observados na prática clínica, facilitando o transporte de estudos que permitam melhor compreender a fisiopatologia da doença, permitindo programar intervenções melhor controladas.

Em nosso estudo, após quase dois anos de tentativas, conseguimos obter o modelo descrito em métodos, ao qual acrescentamos desafios inalatórios por trinta dias, durante quinze minutos, após a primeira inalação de OVA 1%. Além disso, no período de fase piloto, por causa da dificuldade de importação de material de consumo, decidimos por utilizar uma ovoalbumina de origem nacional (Albumina de ovo liofilizada, Advanced Nutrition Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), a qual proporcionou parâmetros inflamatórios no lavado bronco-alveolar, semelhantes aos obtidos com a ovoalbumina ultrapurificada de origem estrangeira (Chicken egg albumin grade III, Sigma-Aldrich).

Aos desafios inalatórios, adicionamos mais duas injeções intra-peritoneais, para a manutenção do processo inflamatório nos níveis observados em estudos que realizaram sete desafios em dias intercalados. Realizamos na fase piloto, um experimento onde não foram administrados as injeções adicionais de OVA+Al(OH)₃. A não realização das injeções adicionais reduziu a intensidade da inflamação, a valores semelhantes aos controles, que apenas receberam inalações de salina.

No início deste trabalho, antes da proposta das injeções i.p., tentamos promover a sensibilização por meio de injeções intra-musculares, não se conseguindo inflamar as vias aéreas, e tampouco promover a formação de anticorpos IgG e IgE anafilática, avaliada por meio da reação de anafilaxia cutânea passiva. Na fase seguinte, após busca na literatura, abandonamos o modelo de sensibilização intra-muscular e direcionamos o estudo para os modelos clássicos, com injeção i.p.. Nosso protocolo partiu da reprodução de um dos modelos propostos na literatura, onde substituiu-se o implante de OVA por injeções i.p. (Russo et al., 1998), e de três inalações diárias de OVA, para apenas um desafio inalatório diário de OVA.

Após obtenção do modelo, procuramos na literatura a dose de salbutamol utilizada nos estudos com camundongos. Praticamente, quase não há estudos onde se usou o salbutamol ou outro agonista β 2-adrenérgico em modelos de inflamação pulmonar crônica em camundongos. Dessa forma,

achamos razoável a administração da mesma concentração de salbutamol (0,1mg/ml) como o realizado em estudo prévio com cobaias (Kasahara, 2001). Até 2002, na literatura observamos a utilização do salbutamol ofertado diretamente no ventilador, com o animal traqueostomizado ou entubado, ou em estudos *in vitro*, onde o salbutamol é adicionado ao banho do tecido pulmonar estudado.

Os regimes de tratamento utilizados neste trabalho derivam de uma pergunta clínica: “*A mortalidade atribuída do uso de β_2 -agonista pode resultar do tipo de regime empregado?*”. Assim, partimos da hipótese de que o regime diário de salbutamol seria prejudicial à inflamação, enquanto que o regime de demanda (administrada a cada 96 horas) provocaria redução do processo inflamatório no modelo estudado. Em estudo anterior, observou-se que o salbutamol regular (5 vezes por semana) aumentava o título de IgG1 anafilática em cobaias sensibilizadas com OVA, além de reduzir o nível de potássio plasmático, constituindo esse regime de tratamento, um risco para os médicos e principalmente para os pacientes, uma vez que tais achados sugerem maior resposta imunológica e perda de potássio que pode se relacionar com outras comorbidades.

No presente estudo, o título de IgE específica a ovoalbumina observada pela reação de anafilaxia cutânea passiva (PCA) apresentou valores elevados no grupo OVA, enquanto que os camundongos do grupo controle não apresentaram reação positiva após desafio i.v. de OVA.

Neste estudo, a idéia inicial foi avaliar de forma mais controlada, nos dois regimes propostos, a atividade de modulação do processo inflamatório pelo salbutamol, e se possível também, por algum agonista β_2 -adrenérgico de longa ação, como o salmeterol e o formoterol. Uma das hipóteses a ser testada era a atuação dos β_2 -agonistas sobre os linfócitos T *helper*, possivelmente modificando a polarização Th1/Th2. Observamos ainda, no estudo anterior, que os animais tratados sob regime de demanda apresentaram uma melhor tolerância ao antígeno inalatório, observada pelo aumento do tempo de exposição à OVA até o surgimento de sintomas de desconforto respiratório causados por broncoconstricção, o que de certa forma, pode também ser deletério. O maior tempo de exposição ao antígeno inalado representa de algum modo, maior probabilidade de intensificação da inflamação, a menos que o fenômeno de tolerância imunológica ocorra.

O momento de sacrifício dos animais foi baseado em observações da literatura e em nossos dados experimentais. A literatura mostra que existe aumento de células inflamatórias entre 24 a 72 horas após o último desafio antigênico, com pico de eosinófilos em aproximadamente 48 horas (Tomkinson *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2001; Shinagawa & Kojima, 2003). Na fase piloto, durante o processo de obtenção do modelo de inflamação, foi realizada uma avaliação temporal da inflamação, quantificando-se os leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar. Observamos que o pico da

resposta inflamatória coincidia com aquele observado por Tomkinson *et al.* (2001), refletindo uma resposta tardia após administração antigênica.

É importante realçar que o tempo, em que os animais foram sacrificados, representa a fase de resposta tardia ao alérgeno, onde há maior resposta inflamatória como observado em outros estudos experimentais e em dados coletados no laboratório, na fase piloto deste experimento. Não estudamos a fase imediata porque, a pergunta inicial do trabalho referia-se a influência do agonista β 2-adrenérgico sobre o processo inflamatório crônico em vias aéreas e no parênquima pulmonar, e não sobre a resposta de responsividade ou reatividade brônquica. Entretanto, estudar ambas as respostas seria interessante, do ponto de vista de tentar elucidar qual das fases sofre maior influência dos medicamentos adrenérgicos.

O tratamento com salbutamol só foi iniciado a partir do ponto em que o animal estava inflamado. Pode-se perguntar: o que poderia ocorrer quando se administra salbutamol simultaneamente ao momento da indução do processo inflamatório. Apesar dos resultados não estarem sendo apresentados nesta tese de conclusão de doutoramento, os dados de quando se administrou salbutamol desde o início de sensibilização, foram coletados, porém ainda não se concluiu a análise.

Os resultados obtidos por esse trabalho mostram alguns fatos interessantes. Em primeiro lugar, não se observou diferença na produção de

anticorpos anafiláticos da classe da IgE entre os grupos estudados: OVA, OVA+IS e OVA+DS. Apenas os animais do grupo controle produziram títulos detectáveis (figura 13). Podemos especular que há uma tendência de redução do título de IgE em alguns animais do grupo tratado com salbutamol de forma intermitente. Tal fato denota que o salbutamol não apresenta influência sobre a gênese de IgE específica a OVA, apesar de não ter sido mensurada o título de anticorpos IgG1 específica a OVA nos soros, devido ao reduzido volume obtido, e também pela maior relevância da IgE no modelo murino. É um fato curioso, pois no estudo anterior, realizado em cobaias (Kasahara, 2001), observamos que o tratamento cinco vezes por semana (DS) aumenta significativamente o título de IgG1 anafilática, não se observando títulos detectáveis de IgE, mesmo nas cobaias do grupo OVA. Frise-se que em cobaias o anticorpo esperado como resposta antigênica específica é a IgG1. No mesmo estudo, mostramos uma redução de IgG1 anafilática em animais que foram tratadas com salbutamol apenas duas vezes por semana (IS) (Kasahara, 2001).

Possivelmente, no modelo murino a síntese de IgE ou de outros anticorpos anafiláticos não são influenciados pela atividade adrenérgica. Entretanto, esse dado deve ser cuidadosamente analisado, pois não foi realizada cultura de linfócitos e teste de linfoproliferação estimulada com OVA em meio contendo o fármaco estudado, para a dosagem de anticorpos e de atividade linfocitária por quantificação de citocinas. Esse experimento poderia confirmar se existe influência do salbutamol sobre a ativação de

linfócitos T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias ou mesmo anti-inflamatórias, confirmando a atividade imunomoduladora dos agentes β_2 -agonistas sobre os linfócitos e sobre os dados de inflamação apresentados nesta tese.

Na avaliação da atividade inflamatória, o que não foi possível no trabalho anterior, se observa que o tratamento com salbutamol diário (OVA+DS) produziu atenuação da resposta inflamatória observado nos seguintes parâmetros: células totais recuperadas no BAL, neutrófilos e eosinófilos quantificados no BAL e eosinófilos EPO+ no parênquima pulmonar. Os animais tratados de forma intermitente (OVA+IS) tiveram redução significativa do número total de células no BAL, neutrófilos quantificados no BAL, células LMN no parênquima pulmonar e eosinófilos EPO+ no parênquima pulmonar. Assim, estes resultados podem representar uma discreta atividade imunomoduladora regime/dose dependente de salbutamol neste modelo. Observou-se uma tendência de redução, não significativa, de linfócitos no lavado broncoalveolar, nos animais tratados com salbutamol, sobretudo no grupo OVA+DS.

Em cobaias, observou-se que o formoterol, um outro agonista β_2 -adrenérgico de ação prolongada, possui a capacidade de inibir a condutância de vias aéreas após desafio com histamina na fase imediata da resposta induzida por antígeno. Além disso, Sugiyama *et al.* (1992) observaram que esse medicamento poderia reduzir o influxo celular para o

compartimento de vias aéreas, estudado por meio da quantificação de leucócitos no lavado broncoalveolar, após administração de dose única de formoterol por via inalatória 10µg/ml durante 2 minutos, 15 minutos antes do desafio com histamina (Sugiyama *et al.*, 1992). Em nosso trabalho, observamos também redução de leucócitos no lavado broncoalveolar, após tratamento prolongado com salbutamol.

A participação dos agentes β_2 -adrenérgicos sobre a inflamação pulmonar, induzida por alérgenos, ainda não está completamente elucidada. Pairam dúvidas, decorrentes de observações clínicas e epidemiológicas quanto a segurança do uso de agentes β_2 -adrenérgicos de curta ação, sendo certa e inquestionável sua precisa atuação nos momentos de crise, provocando o relaxamento da musculatura lisa peribrônquica, com conseqüente melhora dos sintomas respiratórios (Sears *et al.*, 1990; Spitzer *et al.*, 1992).

O clássico trabalho de Sears *et al.* (1990) ainda não foi completamente contradito, e na prática médica, os β_2 -agonistas de curta ação são prescritos com orientação e cuidado.

No presente estudo, observou-se expressiva redução do processo inflamatório (eosinófilos e neutrófilos) no lavado recuperado e no septo alveolar (parênquima), independentemente do regime de tratamento empregado. O uso diário de salbutamol no modelo em estudo proporcionou redução da atividade inflamatória nos compartimentos pulmonares, luz da

via aérea (analisado por meio do lavado brônquico) e parênquima pulmonar. Já na parede das vias aéreas não houve modificação da inflamação desencadeada pela exposição crônica do antígeno.

O uso de salbutamol de forma intermitente provocou atenuação da inflamação de um modo mais proporcional, nos três compartimentos avaliados, com menor efeito na parede de vias aéreas.

A análise da resposta inflamatória nos três compartimentos pulmonares estudados, sob os dois diferentes regimes de tratamento permitem concluir, que no estrito ponto de vista da inflamação, o tratamento intermitente participa como coadjuvante antiinflamatório, não dispensando, é claro, o uso dos tratamentos antiinflamatórios clássicos e fortemente baseados em evidências, como os corticosteróides, administrados na forma inalatória ou mesmo sistêmica.

O fato de nenhum dos dois regimes ter atuado, de forma significativa, no controle da inflamação no nível de parede da via aérea preocupa. Do ponto de vista clínico, busca-se um meio fidedigno, seguro, reprodutível e minimamente invasivo de se obter amostras do ambiente pulmonar de asmáticos, no sentido de se saber com melhor precisão, o estado da inflamação, uma vez que é amplamente conhecida a discordância entre dados clínicos, funcionais pulmonares e o real estado da inflamação, na prática médica.

Os resultados obtidos com o presente trabalho reforçam os achados dos estudos epidemiológicos que associaram mortalidade à quantidade de β_2 -agonista utilizado. Reduzir o componente inflamatório no lavado broncoalveolar, sem a respectiva atenuação na parede de vias aéreas possibilita o mascaramento da inflamação ao se empregar os métodos de escarro induzido ou do lavado brônquico ou alveolar, impedindo a prescrição adequada de corticosteróide aos portadores de asma que fazem uso de β_2 -agonista de curta ação.

A redução da atividade inflamatória no parênquima pulmonar é interessante, uma vez que pacientes com sintomas de asma persistente grave, apresentam inflamação de vias aéreas e de parênquima pulmonar (Kay, 1991; Roche, 1998; Hamid et al., 1997; ENFUMOSA, 2003). O tratamento com agente β_2 -agonista poderia, junto aos corticosteróides reduzir a inflamação nesse compartimento e dessa forma reduzir os sintomas de asma nos pacientes em condições mais graves. Aliás, como tratamento preconizado, já se utiliza uma estratégia semelhante, na qual o paciente utiliza um agente β_2 -adrenérgico de longa ação, associado com corticosteróides administrados na forma de pó aspirável. O uso dessa associação demonstrou, inclusive, redução do remodelamento de vias aéreas após três meses (Orsida et al., 2001).

É lícito afirmar da existência da atuação dos agonistas β_2 -adrenérgicos sobre linfócitos T CD4+, onde podem ocorrer tanto, aumento da resposta inflamatória (Gordon *et al.*, 2003), ou mesmo redução da mesma (Farmer & Pugin, 2000; Miyamoto *et al.*, 2004). Farmer & Pugin (2000) sugerem que os agonistas β_2 -adrenérgicos possam estar associados com a redução da degradação do fator I κ B, dessa forma, aumentando o seqüestro citoplasmático de NF κ B, que é responsável pela sinalização intracelular que leva à síntese de citocinas pró-inflamatórias. Muitos autores afirmam que a atividade antiinflamatória dos agonistas β_2 -adrenérgicos é exercida por meio da redução da atividade de degranulação de mastócitos (Petersen & Skov, 1999; Chong *et al.*, 2003; Scola *et al.*, 2004a; Scola *et al.*, 2004b; Tsuji *et al.*, 2004).

Poucos estudos abordam a possível influência adrenérgica sobre os linfócitos CD4+ na inflamação pulmonar (Holen & Elsayed, 1998; Baramki *et al.*, 2002). Nenhum dos trabalhos descritos na literatura comparou *in vivo* regime de tratamento intermitente e regular de agente β_2 -agonista, como foi realizado neste protocolo. No presente estudo, pode-se afirmar que o tratamento com salbutamol influenciou na redução de eosinófilos no lavado broncoalveolar e na parede de parênquima pulmonar. Considerando-se que a atividade inflamatória mensurada ocorreu na fase tardia e não na imediata, podemos concluir que existe um mecanismo, possivelmente sobre linfócitos T CD4+, que possa ter sido atenuado pelo tratamento com salbutamol. Essa

imunomodulação adrenérgica provocaria uma redução de citocinas pró-inflamatórias, como observado por Farmer & Pugin (2000) e aumento da expressão de citocinas antiinflamatórias, como a IL-12 e o IFN- γ . Dessa forma, a hipótese sugerida justificaria a redução da quantidade de células inflamatórias recuperadas pelo lavado broncoalveolar e de neutrófilos e eosinófilos no mesmo líquido. Entretanto, na parede de vias aéreas, apesar de apresentar um influxo inflamatório menor nos animais tratados com salbutamol, não foi possível detectar tais diferenças através da técnica de morfometria de contagem de células.

Uma possível abordagem experimental para elucidar a questão é fazer cultura de linfócitos coletados de pacientes com asma, pela técnica de broncoscopia com lavado broncoalveolar ou mesmo utilizando-se escarro induzido, fazendo-se a separação celular e cultivando-os em meios de cultura contendo alta e outra baixa concentração de salbutamol. Após isso, dever-se-á quantificar as citocinas presentes no sobrenadante, a expressão molecular das mesmas e de sinalizadores intracelulares como STAT3 e STAT4, e realizar citometria de fluxo, para se saber se há alguma diferença entre os linfócitos de um sujeito asmático que pouco utilize o salbutamol, daquele que faz uso crônico e quase regular de β_2 -agonista.

Resumindo, conseguimos elaborar um modelo de inflamação crônica com predominância de eosinófilos, induzida por alérgeno inalatório adequado para as perguntas experimentais deste trabalho, no qual se exigiu período

de inflamação pulmonar superior a 30 dias. Os resultados experimentais com dois regimes de salbutamol sugerem que exista redução da inflamação (considerando eosinófilos e neutrófilos) no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar. Essa redução do processo inflamatório não foi ocasionada por modulação da produção de anticorpos IgE específicos ao alérgeno. Portanto o agonista β_2 -adrenérgico não possui papel na expressão de anticorpos pelos Linfócitos B no modelo estudado

Conclusões

1. Obtivemos um modelo de inflamação crônica induzida por ovoalbumina em camundongos Balb/c a qual apresentou predominância de eosinófilos e neutrófilos durante pelo menos 30 dias, sendo útil para estudos farmacológicos crônicos, ou mesmo de fisiopatologia através de tratamentos crônicos com inibidores ou indutores da atividade inflamatória.
2. Salbutamol administrado de forma intermitente (a cada 96 horas) apresentou redução da inflamação, observada no lavado broncoalveolar, na quantificação de células linfomononucleares na parede de vias aéreas e na quantificação de eosinófilos EPO⁺ no parênquima pulmonar.
3. Salbutamol administrado diariamente apresentou redução da resposta inflamatória no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar.
4. Os resultados dos grupos tratados com agonista β_2 -adrenérgico demonstram a participação adrenérgica na resposta inflamatória, modulando-as de forma dose dependente, possivelmente pela ativação dos receptores adrenérgicos presentes na superfície dos linfócitos T CD4⁺.

Referências



Abraha D, Cho SH, Agrawal DK, Park JM, Oh CK. (S,S)-formoterol increases the production of IL-4 in mast cells and the airways of a murine asthma model. **Int Arch Allergy Immunol.** 2004; 133(4):380-388.

Abramson MJ, Bailey MJ, Couper FJ, Driver JS, Drummer OH, Forbes AB, McNeil JJ, Walters EH. Are asthma medications and management related to death from asthma? **Am J Respir Crit Care Med.** 2001; 163: 12-18.

Albertine KH, Wang L, Watanabe S, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Temporal correlation of measurements of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2002; 283(1): L219-233.

Baramki D, Koester J, Anderson AJ, Borish L. Modulation of T-cell function by (R)- and (S)-isomers of albuterol: anti-inflammatory influences of (R)-isomers are negated in the presence of the (S)-isomer. **J Allergy Clin Immunol.** 2002; 109(3):449-54.

Barnes PJ. Beta-adrenergic receptors and their regulation. **Am J Respir Crit Care Med.** 1995; 152: 838-860.

Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC. Asthma: basic mechanism and clinical management. 3th Ed. 1998; Academic Press Limited, San Diego, EUA.

Bates JH, Irvin CG. Measuring lung function in mice: the phenotyping uncertainty principle. **J Appl Physiol.** 2003; 94(4):1297-306.

Bennett MR. One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors. **Clin Auton Res.** 1999; 9(3):145-59.

Bhagat R, Swystun VA, Cockcroft DW. Salbutamol-induced increased airway responsiveness to allergen and reduced protection versus methacholine: dose response. **J Allergy Clin Immunol.** 1996; 97(1 Pt 1):47-52.

Bhagat R, Kalra S, Swystun VA, Cockcroft DW. Rapid onset of tolerance to the bronchoprotective effect of salmeterol. **Chest.** 1995; 108(5):1235-9.

Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AM, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. **J Allergy Clin Immunol.** 1991; 88(4):661-74.

Burrows B, Lebowitz MD, The β -agonist dilemma. **New Engl. J Med.** 1992; 326(8): 560-1.

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

Campbell WB, Halushka PV. Autacóides derivados de lipídios. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman-Gilman A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Ed. 9 1996; Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 438-449.

Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. **Eur Respir J.** 1996; 9: 709-715.

Cheng G, Arima M, Honda K, Hirata H, Eda F, Yoshida N, Fukushima F, Ishii Y, Fukuda T. Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. **Am J Respir Crit Care Med.** 2002; 166: 409-416.

Chin JE, Winterrowd GE, Hatfield CA, Brashler JR, Griffin RL, Vonderfecht SL, Kolbasa KP, Fidler SF, Shull KL, Krzesicki RF, Ready KA, Dunn CJ, Sly LM, Staite ND, Richards IM. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in the antigen-induced infiltration of eosinophils and lymphocytes into the airways in a murine model of pulmonary inflammation. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1998; 18: 158-167.

Chong LK, Suvarna K, Chess-Williams R, Peachell PT. Desensitization of beta2-adrenoceptor-mediated responses by short-acting beta2-adrenoceptor agonists in human lung mast cells. **Br J Pharmacol.** 2003; 138(3):512-20.

Cieslewicz G, Tomkinson A, Adler A, Duez C, Schwarze J, Takeda K, Larson KA, Lee JJ, Irving CG, Gelfand EW. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. **J Clin Invest.** 1999; 104: 301-308.

Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. **Blood.** 1989; 73: 1504-1512.

Cockcroft DW, O'Byrne PM, Swystun VA, Bhagat R. Regular use of inhaled albuterol and the allergen-induced late asthmatic response. **J Allergy Clin Immunol.** 1995; 96(1):44-9.

Cockcroft DW, McParland CP, Britto SA, Swystun VA, Rutherford BC. Regular inhaled salbutamol and airway responsiveness to allergen. **Lancet.** 1993; 342 (8875):833-7.

Crane J, Pearce N, Flatt A, Burgess C, Jackson R, Kwong T, Ball M, Beasley R. Prescribed fenoterol and death from asthma in New Zealand, 1981-83:case-control study. **Lancet.** 1989; 1(8644):917-22.

D'Ambrosio D, Mariani M, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. **Am J Respir Crit Care Med.** 2001; 164: 1266-1275.

Dohi M, Tsukamoto S, Nagahori T, Shinagawa K, Saitoh K, Tanaka Y, Kobayashi S, Tanaka R, To Y, Yamamoto K. Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma. **Lab Invest.** 1999; 79: 1559-1571.

Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM, Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. **N Engl J Med.** 2000; 340: 197-206.

ENFUMOSA study group. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. **Eur Respir J.** 2003; 22: 470-7.

Erjefält I, Persson CGA. Long duration and high potency of antiexudative effects of formoterol in guinea-pig tracheobronchial airways. **Am Rev Respir Dis.** 1991; 144: 788-791.

Evans KLJ, Bond RA, Corry DB, Shardonofsky FR. Frequency dependence of respiratory system during induced constriction in a murine model of asthma. **J Appl Physiol.** 2003; 94: 245-252.

Farmer P, Pugin J. β -adrenergic agonist exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the I κ B/NF- κ B pathway. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2000; 279: L675-L682.

Fowler SJ, Dempsey OJ, Sims EJ, Lipworth BJ. Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. Relationship to asthma severity and β_2 -receptor genotype. **Am J Respir Crit Care Med.** 2000; 162: 1318-1322.

Gauvreau GM, Jordana M, Watson RM, Cockcroft DW, O'Byrne PM. Effect of regular inhaled albuterol on allergen-induced late responses and sputum eosinophils in asthmatic subjects. **Am J Respir Crit Care Med.** 1997; 156(6): 1738-45.

Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. **Nature.** 1996; 383(6599):447-50.

Gordon JR, Swystun VA, Li F, Zhang X, Davis BE, Hull P, Cockcroft DW. Regular salbutamol use increases CXCL8 responses in asthma: relationship to the eosinophil response. **Eur Respir J.** 2003; 22(1):118-26.

Grainger J, Woodman K, Pearce N, Crane J, Burgess C, Kaene A, Beasley R. Prescribed fenoterol and death from asthma in New Zealand 1981-87: a further case control study. **Thorax.** 1991; 46: 105-111.

Hamelmann E, Takeda K, Schwarze J, Vella AT, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999; 21: 480-489.

Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. **J Allergy Clin Immunol.** 1997; 100: 44-51.

Hantos Z, Brusasco V. Assessment of respiratory mechanics in small animals: the simpler the better? **J Appl Physiol.** 2002; 93(4):1196-1197.

Hayes MJ, Rhodes CG, Rahman SU, Ind PW, Sriskandan S, Jones T, Hughes JMB. In vivo quantification of human pulmonary β -adrenoceptors: effects of β -agonist therapy. **Am J Crit Care Med.** 1996; 154: 1277-1283.

Holen E, Elsayed S. Effects of beta2 adrenoceptor agonists on T-cell subpopulations. **APMIS.** 1998; 106(9):849-57 [abstract].

Huang CD, Chen HH, Wang CH, Chou CL, Lin SM, Lin HC, Kuo HP. Human neutrophil-derived elastase induces airway smooth muscle cell proliferation. **Life Sci.** 2004; 74(20): 2479-92.

Inman MD, Ellis R, Wattie J, Denburg JA, O'Byrne PM. Allergen-induced increase in airway responsiveness, airway eosinophilia, and bone-marrow eosinophil progenitors in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999; 21: 473-479.

Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Martel JAO, Platts-Mills TAE, Ring J, Thien F, Cauwenberge PV, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of

the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **J Allergy Clin Immunol.** 2004; 113: 832-6.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica.** 10ª Edição 2004; Ed. Guanabara Koogan, São Paulo, Brasil.

Kelsen SG, Higgins NC, Shuangwen Z, Mardini IA, Benovic JL. Expression and function of the beta-adrenergic receptor coupled-adenylyl cyclase system on human airway epithelial cells. **Am J Respir Crit Care Med.** 1995; 152: 1774-83.

Kuwano K, Bosken CH, Paré PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. **Am Rev Respir Dis.** 1993; 148: 1220-1225.

Lapa e Silva JR, Bachelet CM, Pretolani M, Baker D, Sheper RJ, Vargaftig BB. Immunopathologic alterations in the bronchi of immunized guinea pigs. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1993; 9: 44-53.

Leick-Maldonado, EA. **Efeitos dos tratamentos com montelucaste e dexametasona na inflamação crônica de vias aéreas de cobaias.** São Paulo, 2002. [Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da USP].

Kamada AK. Therapeutic controversies in the treatment of asthma. **Ann Pharmacother.** 1994; 28(7-8):904-14.

Kasahara DI, Costa FMA, Martins MA, Nunes MPT. Inflamação pulmonar crônica: comparação entre ovoalbumina nacional e importada. 2002. **Anais da FeSBE.** 14.008.

Kasahara DI **Estudo dos efeitos do fármaco agonistas β_2 -adrenérgicos em modelo de inflamação crônica das vias aéreas em**

cobaia. São Paulo, 2001. [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da USP].

Kay AB. Asthma and Inflammation. **J Allergy Clin Immunol**. 1991; 87(5): 893-910.

Kelsen SG, Aksoy MO, Brennan K, Ciccolella D, Borbely B. Chronic effects of inhaled albuterol on beta-adrenoceptor system function in human respiratory cells. **J Asthma**. 2000; 37(4):361-70.

Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Jones H, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 1995; 12: 404-409.

Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt M, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tiberio IF. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic inflammation in guinea pigs. **Clin Exp Allergy**. 2004; 34(1): 145-52.

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(3):255-62.

Leong KP, Huston DP. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. **Ann Allergy Asthma Immunol**. 2001; 87: 96-110.

Lindén A, Adachi M. Neutrophilic airway inflammation and IL-17. **Allergy** 2002; 57: 769-775.

Liu YC, Khawaja AM, Rogers DF. Pathophysiology of airway mucus secretion in asthma. in Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, **Asthma. Basic**

mechanisms and clinical management. 1998; Academic Press, San Diego, EUA, 205-277.

Lundblad LK, Irvin CG, Adler A, Bates JH. A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. **J Appl Physiol.** 2002; 93(4):1198-1207.

Macklem PT. The physiology of small airways. **Am J Respir Crit Care Med.** 1998; 157: S181-S183.

Mäkelä MJ, Kanehiro A, Dakhama A, Loader J, Joetham A, Xing Z, Jordana M, Larsen GL, Gelfand EW. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. **PNAS.** 2000; 97 (11): 6007-6012.

Maselli R, Paciocco G. Asthma: pathophysiology of the bronchial obstruction. **Allergy.** 2000; 55(Suppl.61): 49-51.

McIvor RA, Pizzichini E, Turner MO, Hussack P, Hargreave FE, Sears MR. Potential masking effects of salmeterol on airway inflammation in asthma. **Am J Respir Crit Care Med.** 1998; 158: 924-930.

Melgert BN, Postma DS, Geerlings M, Luinge MA, Klok PA, van der Strate BW, Kerstjens HA, Timens W, Hylkema MN. Short-term smoke exposure attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in allergic mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2004; 30(6):880-885.

Menard L, Ferguson SS, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. **Mol Pharmacol.** 1997; 51(5):800-8.

Miyamoto M, Tomaki M, Lötvall J, Lindén A. β -adrenoceptor stimulation and neutrophils accumulation in mouse airways. **Eur Respir J.** 2004; 24: 231-237.

Moriya HT, Moraes JC, Bates JH. Nonlinear and frequency-dependent mechanical behavior of the mouse respiratory system. **Ann Biomed Eng.** 2003; 31(3):318-26.

Mota I, Perini A. A heat labile mercaptoethanol susceptible homocytotropic antibody in the guinea pig. **Life Science** 1970; 9(2): 923-930.

Mota I, Wong D. Homologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antiserum during the course of immunization. **Life Sci.** 1969; 8: 813-20.

NIH (National Institute of Health). Breath of life exhibit. <http://www.nlm.nih.gov/hmd/breath/sitemap/sitemap.html> (acessado em 07 de agosto de 2004).

NIH (National Institute of Health). National Heart, Lung and Blood Institute. **National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 2- Guidelines for the diagnosis and management of asthma.** 1998; NIH, publication 98-4051.

National Institute of Health. **GINA: Global Initiative for Asthma.** 2002; NIH, publication 02-3659.

Nelson DI, Cox MM. **Lehninger princípios de bioquímica.** 3ed., São Paulo: Sarvier, 2002.

O'Byrne PM, Dolovich J, Hargreave FE. Late asthmatic responses. **Am Rev Respir Dis.** 1987; 136: 740-751.

Oettgen HC, Geha RS. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. **J Clin Invest.** 1999; 104(7): 829-835.

Orsida BE, Ward C, Li X, Bish R, Wilson JW, Thien F, Walters EH. Effect of a long-acting β_2 -agonist over three months on airway wall vascular remodeling in asthma. **Am J Respir Crit Care Med.** 2001; 164: 117-121.

Ovary Z. **Passive cutaneous anaphylaxis. Immunological Methods.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.259, 1964.

Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Di Lucia P, D'Ambrosio D, Lang L, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F. β_2 -agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **J Clin Invest.** 1997; 100: 1513-1519.

Page SM, Gleich GJ, Roebuck KA, Thomas LL. Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granulate major basic protein. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999; 21: 230-237.

Penn RB, Panettieri RA, Benovic JL. Mechanisms of acute desensitization of the β_2 -AR-adenyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1998; 19: 338-348.

Pereira CAC, Naspitz C, et al., Il Consenso brasileiro no manejo da asma (1998). **J Pneumol.** 1998; 24(4).

Petersen LJ, Skov PS. The effects of salmeterol and salbutamol on mediator release and skin responses in immediate and late phase allergic cutaneous reactions. **Inflamm Res.** 1999; 48: 527-532.

Piper PJ, Samhoun MN. Leukotrienes. **Br Med Bull.** 1987; 43: 297-311.

Ramoutsaki IA, Dimitriou H, Markaki EA, Kalmanti M. Management of childhood diseases during the Byzantine period: III- respiratory diseases of childhood. **Pediatr Int.** 2002; 44(4):460-2.

Rea HH, Scragg R, Jackson R, Beaglehole R, Fenwick J, Sutherland DC. A case control study of deaths from asthma. **Thorax.** 1986; 41: 833-839.

Rio EM., Gallo PR, Reis AO. Mortalidade por asma no município de São Paulo, 1993-1995: análise por causa múltipla de morte. **Cad Saúde Pública.** 2003; 19(5): 1541-4.

Roche WR. Inflammatory and structural changes in the small airways in bronchial asthma. **Am J Respir Crit Care Med.** 1998; 157: S191-S194.

Rothemberg M.E. Eotaxin. An essencial mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999; 21: 291-295.

Russo M, Jancar S, Pereira de Siqueira AL, Mengel J, Gomes E, Ficker SM, Caetano de Faria AM. Prevention of lung eosinophilic inflammation by oral tolerance. **Immunol Lett.** 1998; 61(1): 15-23.

Sakai H, Ingenito EP, Mora R, Abbay S, Cavalcante FS, Lutchen KR, Suki B. Hysteresivity of the lung and tissue strip in the normal rat: effects of heterogeneities. **J Appl Physiol.** 2001; 91(2):737-47.

Sears MR, Taylor DR, Print CG, Lake DC, Li QQ, Flannery EM, Yates DM, Lucas MK, Herbison GP. Regular inhaled beta-agonist treatment in bronchial asthma. **Lancet.** 1990; 336(8728):1391-6.

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

Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling. Strain differences. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003; 168: 959-67.

Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Regulation of helper T cell differentiation and recruitment in airway inflammation. **Am J Respir Crit Care Med.** 2000; 162: S157-S160.

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

Sly PD, Collins RA, Thamrin C, Turner DJ, Hantos Z. Volume dependence of airway and tissue impedances in mice. **J Appl Physiol.** 2003; 94(4):1460-6.

Solway J, Fredberg JJ. Perhaps airway smooth muscle dysfunction contributes to asthmatic bronchial hyper-responsiveness after all. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1997; 171: 144-146.

Spitzer WO, Suissa S, Ernst P, Horwitz RI, Habbick B, Cockcroft D, Boivin JF, McNutt M, Buist AS, Rebeck AS. The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma. **N Engl J Med.** 1992; 326(8):501-6.

Spitzer WO, Ernst P, Suissa S, Boivin JF, Horwitz RI, Habbick B, Cockcroft D, McNutt M, Buist AS. Fenoterol and death from asthma. **Med J Aust.** 1992; 157(8):567-8.

Spoeltra FM, Kauffman HF, Hovenga H, Noordhoek JA, de Monchy JGR, Postma DS. Effects of budesonide and formoterol on eosinophil activation induced by human lung fibroblasts. **Am J Respir Crit Care Med.** 2000; 162: 1229-1234.

Stämpfli MR, Cwiartka M, Gajewska BU, Alvarez D, Ritz SA, Inman MD, Xing Z, Jordana M. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1999; 21: 548-596.

Stanciu LA, Djukanovic R. The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. **Eur Respir J.** 1998; 11: 949-957.

Stevens CA, Turner D, Kuehni CE, Couriel JM, Silverman M. The economic impact of preschool asthma and wheeze. **Eur Respir J.** 2003; 21(6): 1000-6.

Strader CD, Sigal IS, Dixon RAF. Structural basis of β -adrenergic receptors. **FASEB J.** 1989; 3: 1825-1832.

Sugiyama H, Okada C, Bewtra AK, Hopp RJ, Townley RG. The effect of formoterol on the late asthmatic phenomena in guinea pigs. **J Allergy Clin Immunol.** 1992; 89: 858-66.

Swystun VA, Gordon JR, Davis EB, Zhang X, Cockcroft DW. Mast cell tryptase release and asthmatic responses to allergen increase with regular use of salbutamol. **J Allergy Clin Immunol.** 2000; 106(1 Pt 1):57-64.

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.

Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophils localization in the lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2001; 281: L394-L402.

Ten RM, Pease LR, Mc Kean DJ, Bell MP, Gleich GJ. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. **J Exp Med.** 1989; 169(5): 1757-69.

Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, Larson KA, Lee JJ, Gelfand EW. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. **Am J Respir Crit Care Med.** 2001; 163: 721-730.

Tsuji T, Kato T, Kimata M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Differential Effects of beta(2)-Adrenoceptor Desensitization on the IgE-Dependent Release of Chemical Mediators from Cultured Human Mast Cells. **Biol Pharm Bull.** 2004; 27(10):1549-54.

Twentyman OP, Finnerty JP, Harris A, Palmer J, Holgate ST. Protection against allergen-induced asthma by salmeterol. **Lancet.** 1990; 336: 1338-42.

Scola AM, Chong LK, Chess-Williams R, Peachell PT. Influence of agonist intrinsic activity on the desensitisation of beta2-adrenoceptor-mediated responses in mast cells. **Br J Pharmacol.** 2004a; 143(1):71-80.

Scola AM, Chong LK, Suvarna SK, Chess-Williams R, Peachell PT. Desensitisation of mast cell beta2-adrenoceptor-mediated responses by salmeterol and formoterol. **Br J Pharmacol.** 2004b; 141(1):163-71.

Venge P. **Eosinophils** in Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, **Asthma. Basic mechanisms and clinical management.** 1998; Academic Press, San Diego, EUA.

Wahedna I, Wong CS, Wisniewski AFZ, Pavord ID, Tattersfield AE. Asthma control during and after cessation of regular beta₂-agonist treatment. **Am Rev Respir Dis.** 1993; 148: 707-712.

Warth MPTN, Maldonado EAL, Fernezlian SM, Leme AS, Perini A, Saldiva PHN, Martins MA. Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. **Am J Physiol.** 1995; 268 (Lung, Cellular and Molecular Physiology 12): L781-8.

Wilder JA, Collie DDS, Wilson BS, Bice DE, Lyons CR, Lipscomb MF. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. **Am J Respir Cell Mol Bio.** 1999; 20: 1326-1334.

Xiu Q, Fujimura M, Nomura M. Bronchial hyperresponsiveness and airway neutrophil accumulation induced by interleukin-8 and the effect of the thromboxane A₂ antagonist S-145 2 in guinea-pigs. **Clin Exper Allergy** 1995; 25: 51-59.

Yoshikawa S, Kayes SG, Parker JC. Eosinophils increase lung microvascular permeability via the peroxidase-hydrogen peroxide-halide system: bronchoconstriction and vasoconstriction unaffected by eosinophil peroxidase inhibition. **Am Rev Respir Dis.** 1993; 147: 914-920.

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. **J Biol Chem.** 1996; 271(31):18302-5.

Zucker-Fraklin D, Grusky G. The identification of eosinophil clones in soft-agar cultures by differential staining peroxidase. **J Histochem Cytochem.** 1976; 24(12): 1270-72.