Deborah de Camargo Hizume

**Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a
inflamação, responsividade e remodelamento
pulmonares em camundongos com inflamação
pulmonar alérgica crônica**

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

Área de Concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos
Orientador: Prof. Dr. Milton de Arruda Martins

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Hizume, Deborah de Camargo

Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a inflamação, responsividade e remodelamento pulmonares em camundongos com inflamação pulmonar alérgica crônica / Deborah de Camargo Hizume. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Processos Inflamatórios e Alérgicos.

Orientador: Milton de Arruda Martins.

Descritores: 1.Asma 2.Fumaça 3.Tabaco 4.Remodelamento 5.Inflamação
6.Hiper-reatividade 7.Camundongos

USP/FM/SBD-114/10

EPÍGRAFE

SONETO

*“Verdade, Amor, Razão, Merecimento
Qualquer alma farão segura e forte,
Porém Fortuna, Caso, Tempo e Sorte
Têm do confuso mundo o regimento.*

*Efeitos mil revolve o pensamento,
E não sabe a que causa se reporte;
Mas sabe que o que é mais que vida e morte
Que não o alcança humano entendimento.*

*Doutos varões darão razões sabidas,
Mas são experiências mais provadas,
E por isto é melhor ter muito visto.*

*Cousas há aí que passam sem ser cridas,
E cousas cridas há sem ser passadas,
Mas o melhor de tudo é crer em Cristo.”*

Luís de Camões *1524/1525

1579/1580

AGRADECIMENTOS

*À querida e amada Ercília Hizume,
Pela alegria a cada passo meu como se fosse o primeiro deles, e por ensinar-me a
andar no caminho aplainado do Criador.*

**“Onde não há conselho fracassam os projetos, mas com os muitos
conselheiros há bom êxito.”
Provérbios 15:22**

*Ao querido Professor Milton, cujas generosidade e confiança têm me presenteado
desde os tempos do mestrado. Desfrutar de seu convívio e amizade é grande
privilégio, e trabalhar em seu laboratório é motivo de alegria e motivação
constantes.*

*Ao Henrique T. Moriya, pela disposição e auxílio nas medidas de mecânica
pulmonar.*

À Alessandra Choqueta, pela disponibilidade na fase experimental.

Ao Rodolfo de Paula Vieira, pelas idéias, incentivo e companheirismo.

*À Beatriz Manguiera Saraiva-Romanholo, que com gentileza e cuidados confortou-
me durante todo o doutorado.*

*À Francine Almeida, pelo esmero no processamento e leitura das lâminas de lavado
broncoalveolar.*

Ao Renato Moschella, pelo cuidado com os animais.

Ao Lucas Faustino e Dr. Montchillo Russo, pelo auxílio nas medidas de IgE total.

À querida Dolores Rivero, cuja companhia sempre traz ânimo e riso.

À Ângela Santos, do laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia, pela dedicação na confecção das muitas lâminas.

Às técnicas do laboratório de Histologia do Departamento de Patologia, pelo incansável trabalho na confecção das lâminas.

A Luís Fernando Ferraz, Maína Morales, Tatiana Lanças e Rui Camargo Neto, pela amizade e paciência em minha iniciação ao maravilhoso mundo da análise de imagens.

À Dra. Marisa Dolhnikoff, pelo ensino nos estudos morfométricos de pulmão.

Aos colegas do LIM 20 e LIM 5, pela convívio e auxílio.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade.

"Em todo o tempo ama o amigo, e na angústia se faz o irmão."

Provérbios 17:17

À família Bezerra Lima, cujo amor e cuidados independem de distância, tempo ou circunstância.

Aos queridos "Motte's", cuja disposição e amor em ajudar se demonstra em todos os seus gestos.

À querida mana Regina Oliveira, pela alegria fraterna e mão estendida em todo tempo, pelos puxões de orelha, conselhos e incentivo. Sempre dou graças a Deus pela sua vida.

Às queridas Bea e Rosane, pela amizade e carinho que perduram e amadurecem.

Ao Valdir Noll, pela disposição e auxílio nas análises de correlação estatística.

À Igreja Batista Reformada Vida Nova em Florianópolis, pelas orientações, cuidado e orações constantes. É bom voltar para casa!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Asma	2
1.1.1	Definição	2
1.1.2	Prevalência e mortalidade	3
1.1.3	Fisiopatologia da asma.....	4
1.1.4	Remodelamento pulmonar	8
1.1.5	Hiperresponsividade brônquica	10
1.2	Efeitos pulmonares do tabagismo	12
1.2.1	Tabagismo e asma	13
1.3	Modelos experimentais de asma e tabagismo	14
1.3.1	Modelos experimentais de asma	14
1.3.2	Modelos experimentais de tabagismo	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	MÉTODOS.....	20
3.1	Animais	21
3.2	Protocolo Experimental	22
3.2.1	Sensibilização dos animais	23
3.2.2	Método de exposição à fumaça de cigarro	24
3.3	Avaliação da mecânica respiratória	26
3.3.1	Curva dose-resposta à metacolina	29
3.4	Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)	29
3.5	Avaliação do título de IgE total.....	30

3.6	Histoquímica e Imunohistoquímica	30
3.6.1	Histoquímica.....	30
3.6.2	Imunohistoquímica	31
3.7	Análise morfológica dos pulmões	32
3.8	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Mecânica pulmonar.....	36
4.2	IgE e lavado broncoalveolar.....	40
4.2.1	IgE	40
4.2.2	Lavado Broncoalveolar (LBA).....	40
4.3	Expressão celular para respostas Th1 e Th2.....	47
4.4	Remodelamento pulmonar	53
5	DISCUSSÃO	58
5.1	Hiperresponsividade pulmonar.....	59
5.2	Resposta imune	61
5.3	Remodelamento pulmonar	64
5.4	Limitações do estudo e considerações gerais.....	67
6	CONCLUSÕES	71
7	REFERÊNCIAS	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIH - do inglês, *National Institute of Health*

Ig - Imunoglobulina

CD - do inglês, *Cluster of Differentiation*

Th - do inglês, *T helper*

IL - Interleucina

NO - Óxido nítrico

MMPs - do inglês, *Matrix metalloproteinases*

TIMPs - do inglês, *Tissue Inhibitors Metalloproteinases*

ETS - do inglês, *Environmental Tobacco Smoke*

OVA - Ovoalbumina

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

OF - Grupo experimental coexposto à OVA+fumaça de cigarro

NaCl - Cloreto de sódio

CO - Monóxido de carbono

ppm - partes por milhão

I_{aw} - Inertância da via aérea

Mch - Metacolina

Z(f) - Impedância

R_{aw} - Resistência das vias aéreas

G_{tis} - Resistência dos tecidos

H_{tis} - Elastância dos tecidos

LBA - Lavado broncoalveolar

PBS - do inglês, *Phosphate **B**uffered **S**aline*

PS - Picrossírius

INF- γ - Interferon- γ

TGF- β - do inglês, *Transforming **G**rowth **F**actor **beta***

ANOVA - Análise de variância

CTGF - do inglês, *Connective **T**issue **G**rowth **F**actor*

PAS/AB - do inglês, *Periodic Acid **S**chiff e Alcian **B**lue*

LISTA DE FIGURAS E TABELA

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 –	Esquema do protocolo experimental	23
Figura 2 –	Esquema ilustrativo da caixa de exposição	25
Figura 3 –	Diagrama esquemático do flexiVent	27
Figura 4 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e ovoalbumina (OVA) na responsividade brônquica para Raw...37	
Figura 5 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA na responsividade brônquica para Gtis.....38	
Figura 6 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA na responsividade brônquica para Htis.39	
Figura 7 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre os níveis séricos de IgE.41	
Figura 8 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número total de células no LBA.....42	
Figura 9 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de eosinófilos no LBA.....43	
Figura 10 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de neutrófilos no LBA.44	
Figura 11 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de linfócitos no LBA.....45	
Figura 12 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de macrófagos no LBA.....46	
Figura 13 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células inflamatórias peribroncovasculares positivas para IL-4.48	
Figura 14 –	Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células inflamatórias peribroncovasculares positivas para IL-5.49	

Figura 15 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células inflamatórias peribroncovasculares positivas para INF- γ	50
Figuras 16 e 17 – Painéis de fotomicrografias de células positivas para IL-4 e INF- γ	51
Figura 18 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células epiteliais positivas para IL-10.	52
Figura 19 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o conteúdo de fibras colágenas no espaço peribroncovascular.	54
Figura 20 – Paineis de fotomicrografias do conteúdo de fibras colágenas peribroncovasculares.....	55
Figura 21 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células MMP9 positivas do compartimento peribroncovascular.	56
Figura 22 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células epiteliais TGF- β positivas.	57
Tabela 1 – Composição do cigarro da marca Derby, Souza Cruz	26

RESUMO

Hizume DC. *Efeitos da curta exposição à fumaça de cigarro sobre a inflamação, responsividade e remodelamento pulmonar em animais com inflamação pulmonar alérgica crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010. 84p.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição à fumaça de cigarro – ativa ou passiva – está altamente correlacionada ao agravamento e severidade do quadro asmático, que inclui inflamação, hiperresponsividade e remodelamento pulmonar. Os modelos experimentais que conjugam asma e tabagismo, em geral, abordam apenas alguns aspectos isolados desta complexa relação, e carecem de elucidação sobre as possíveis inter-relações existentes. Neste modelo experimental, a proposta foi analisar os efeitos da coexposição de curta duração à fumaça de cigarro – do tipo “mainstream” - e alérgeno em camundongos previamente sensibilizados, focando as características fisiopatológicas e funcionais da asma ao final de três semanas. Os resultados demonstraram que o grupo coexposto à OVA e fumaça de cigarro (OF) apresentou diminuição do número total e diferencial de todas as células no lavado broncoalveolar, bem como da expressão celular de INF-gama e IL-4 quando comparados ao grupo OVA. Por outro lado, os parâmetros relativos ao remodelamento pulmonar parecem ser afetados de maneira oposta, demonstrado pelo aumento substancial do conteúdo de colágeno e pela expressão celular de MMP9 e TGF- β no grupo OF. A responsividade pulmonar, por sua vez, apresentou elastância aumentada nos animais com inflamação pulmonar alérgica crônica em comparação aos demais grupos, sugerindo uma correlação entre o número de eosinófilos e a resposta mecânica observada. A atividade de certos componentes específicos da fumaça de cigarro parece influenciar o comportamento das alças regulatórias no processo de inflamação, como sugerido pela expressão celular aumentada de IL-10 nos grupos expostos ao fumo. Conclui-se, portanto, que neste modelo experimental, a variedade de elementos químicos presentes na fumaça do cigarro pode afetar de maneira diferenciada os aspectos da inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos.

Descritores: 1.Aasma 2.Fumaça 3.Tabaco 4.Remodelamento 5.Inflamação 6.Hiper-reatividade 7.Camundongos

SUMMARY

Hizume DC. *Effects of short-term cigarette smoke exposure on inflammation, responsiveness and lung remodeling in chronic allergic pulmonary inflammation mice* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 84p.

Several epidemiologic studies have shown that active as well passive smoking is positively associated with asthma severity, including inflammation, hiperresponsiveness and lung remodeling. Experimental models that conjugate asthma and smoking usually approach isolated aspects of this complex relation and more elucidation is needed about possible mechanisms involved. In this experimental model, the proposal was analyze the effects of short-term cigarette smoke – mainstream – on animals previously sensitized, pointing on physiological and functional characteristics of asthma during three weeks. Results demonstrated coexposed group to allergen and cigarette smoke (OVA+CS group) showed a decrease of total and differential number of all cells of bronchoalveolar lavage, as well cellular expression of INF-gamma and IL-4 when compared to OVA group. On the other hand, parameters related to lung remodeling seemed to be affected in opposite way, demonstrated by an increase of collagen content and cellular expression of MMP9 and TGF-beta of OVA+CS group. Pulmonary responsiveness was increased in tissue elastance in animals with chronic allergic pulmonary inflammation when compared to all groups, suggesting a correlation between eosinophils number and mechanical response observed. The activity of specific cigarette smoke components may influence the behavior of regulatory loops in inflammatory process, as showed by increased cellular expression of IL-10 in cigarette smoke exposed groups. In conclusion, in this experimental model the variety of chemical elements of cigarette smoke may affect in distinct ways aspects related to chronic allergic pulmonary inflammation in mice.

Descriptors: 1.Asthma 2.Smoke 3.Tobacco 4.Remodeling 5.Inflammation 6.Hyper-reactivity 7.Mice

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma

1.1.1 Definição

Atualmente a asma constitui-se em um dos mais sérios problemas de saúde mundial. Milhares de pessoas de todas as idades são acometidas por esta doença, que pode apresentar-se severa e, algumas vezes, fatal (1).

A despeito disto, a asma já era descrita pelos antigos egípcios há mais de 3500 anos atrás nos papiros de Eber, aparecendo também em Ilíada, de Homero. O nome até hoje utilizado foi adotado por Hipócrates, que em grego significa doença de respiração penosa ou pouco fôlego (2).

De acordo com o NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH), define-se asma 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. Dependendo de sua severidade, a limitação ao fluxo aéreo pode estar acompanhada por sintomas como falta de ar, chiado, aperto torácico e tosse. Pode também ser observado em alguns pacientes

produção de secreção, particularmente seguida de exacerbações em sua forma mais crônica e persistente (1).

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” (1).

1.1.2 Prevalência e mortalidade

A prevalência da asma tem aumentado, especialmente entre as crianças. A doença tem sido alvo de muito estudo e preocupação relativos não somente aos altos encargos financeiros que impõe, mas também devido à perda de produtividade e redução do convívio na vida sócio-familiar (1).

Stevens e colaboradores estudaram o impacto econômico da doença em crianças em idade pré-escolar, e observaram que no Reino Unido, os custos de atendimento por causa dos sintomas da asma eram de 2,6 milhões de libras esterlinas (3).

Por outro lado, a mortalidade devido à asma tem caído nos últimos anos nos Estados Unidos da América, como foi demonstrado em um estudo publicado por Sly (4). No ano de 2000, houve uma redução para 1,6 casos por 100.000, possivelmente devido ao melhor direcionamento do tratamento (4).

A despeito destes números, em pesquisa realizada no Brasil, observou-se um aumento do diagnóstico de casos fatais de 1 para 1,165 (5).

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

1.1.3 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 morbi-mortalidade dessa doença, que acarreta prejuízos tanto pessoais como profissionais aos seus portadores (7).

Sabe-se que a asma é desencadeada principalmente por exposição alergênica a antígenos provenientes de diversas fontes. Entre eles, podem ser destacados aqueles relacionados às baratas (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Bromia tropicalis*), animais domésticos, pólen e compostos químicos irritantes como perfumes, solventes orgânicos, pesticidas e metais (8).

Entretanto, outros fatores externos como a exposição ao ar frio, o uso de antiinflamatórios não-esteroidais (ácido acetil-salicílico), o exercício físico, inalação de poluentes atmosféricos, fumaça de cigarro e fatores emocionais também podem desencadear ou agravar uma crise de sintomas de asma (1,8,9).

O primeiro passo para o desenvolvimento do quadro asmático, portanto, é a sensibilização a algum antígeno, na qual as células dendríticas presentes na mucosa brônquica atuam como apresentadoras de antígeno (10,11). A interatividade entre as células dendríticas e os linfócitos T auxiliares resulta na estimulação dos linfócitos B, que iniciam a produção de imunoglobulinas E (IgE). Uma vez liberadas na circulação sanguínea, as imunoglobulinas ligam-se a receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos (11) e, como resultado deste processo, nos próximos contatos com os agentes desencadeantes, a maior parte dos pacientes portadores de asma desenvolve uma fase imediata e uma fase tardia.

A fase imediata caracteriza-se, basicamente, por uma instalação rápida, (10-20 minutos) seguida de obstrução das vias aéreas devido à contração do músculo liso dos brônquios. As imunoglobulinas liberadas ligam-se aos receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos, dando seqüência ao processo inflamatório (11). Já a fase tardia ocorre a partir de 3 horas do contato com o estímulo alergênico, podendo durar vários dias. O processo inflamatório, nesta etapa, decorre de uma grande migração celular para as vias aéreas.

De acordo com o NIH, até agora a grande maioria das informações sobre a patologia da asma tem sido obtida através da análise do tecido pulmonar *pós-mortem* (1).

Macroscopicamente, os pulmões de pacientes que faleceram devido à asma apresentaram em suas vias aéreas de pequeno e grande calibre hiperinsuflação e placas de uma espécie de substância formada de muco, proteínas séricas, células inflamatórias e debris celulares (12).

Já microscopicamente, 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 (principalmente do subtipo CD4+) e, predominantemente eosinófilos, do compartimento intra para o extravascular, com hipersecreção de muco e descamação da superfície epitelial (12,13). Segundo Barnes, essa descamação epitelial promove maior sensibilidade e reatividade da superfície de vias aéreas aos agentes constritores que, somado ao espessamento da membrana basal, pode contribuir para o aumento da rigidez da parede de vias aéreas, resultando em uma resposta de maior intensidade nos parâmetros de mecânica respiratória avaliados na asma (13).

Da perspectiva imunológica, a asma é caracterizada por uma resposta denominada Th2, com liberação de citocinas típicas como interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5, e IL-13) (14-16).

Modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica têm demonstrado que a sensibilização com ovalbumina (OVA) induz à liberação de citocinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5 (17,18).

Apesar de apresentarem funções bastante específicas, as interleucinas são capazes de interagir entre si, e a maioria delas apresenta mais de uma propriedade, além de mediar uma gama de diferentes funções biológicas (19). Esta complexidade pode ser claramente observada no processo asmático.

A IL-4 é capaz de induzir o recrutamento e a ativação de eosinófilos, estimular as células epiteliais a produzirem muco e ainda perpetuar a ativação de mastócitos, responsáveis pela liberação de IgE e IgG1 (19,20). Não obstante, a IL-5 estimula a proliferação, diferenciação, sobrevivência e ativação de eosinófilos na medula óssea, atuando também na liberação de eosinófilos maduros da medula para a circulação, além de desempenhar papel quimioativo para essas células e bloquear os efeitos inibitórios da IL-2 sobre a migração eosinofílica (19-21).

A produção de interleucinas associada a vários mediadores inflamatórios, como neurocininas, histamina e óxido nítrico (NO), dentre outros, pode levar à formação de edema perivascular e peribrônquico, além de recrutamento de células inflamatórias, - especialmente eosinófilos - para a parede da via aérea, ocasionando modificações irreversíveis na estrutura pulmonar, fato este conhecido como remodelamento (1,12).

1.1.4 Remodelamento pulmonar

A inflamação persistente das vias aéreas na asma é um dos principais fatores apontados para o desenvolvimento de um fenômeno denominado remodelamento (22).

O remodelamento refere-se, então, a alterações estruturais observadas na asma, que incluem hipertrofia e hiperplasia de músculo liso da via aérea, fibrose na região da membrana basal sub-epitelial (principalmente devido à deposição de subtipos de colágeno – I e III – e fibronectina), mudanças na composição da matriz extracelular, hiperplasia de células caliciformes, alteração da espessura da mucosa brônquica e aumento da vascularização local (22-24).

Atualmente, muito se discute a respeito da relação da inflamação de vias aéreas e seu processo de remodelamento, na tentativa de se obter uma associação às modificações de mecânica respiratória da asma, caracterizada pela obstrução de vias aéreas (1,7).

O grau dessas modificações patológicas que ocorrem nas vias aéreas também tem sido associado aos níveis de gravidade da doença e queda na função pulmonar dos pacientes asmáticos (25-30).

Kuwano e Carrol (24,25) relataram aumento na camada muscular dos bronquíolos de pacientes asmáticos, considerado uma das características

mais marcantes do remodelamento na asma (22). Tanto a hiperplasia como a hipertrofia da musculatura lisa brônquica podem ser identificadas, e vários estudos correlacionam estes fenômenos à liberação de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas (22,23,29-31).

Em adição às transformações ocorridas no músculo liso das vias aéreas, alterações no epitélio, na mucosa e no parênquima pulmonar, podem igualmente modificar o processo de responsividade brônquica, bem como a persistência dos sintomas (26,27).

Além das vias aéreas, o remodelamento na asma também está associado a um desequilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas da matriz extra- celular, cujos principais componentes proteicos são as fibras colágenas e elásticas, os proteoglicanos e as lamininas (24,31,32). Os fatores que controlam este complexo processo são as metaloproteinases, (MMPs) seus inibidores (TIMPs) e os fatores de crescimento (23,24). Todavia, alguns estudos sugerem que inúmeros mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, podem igualmente estar envolvidos no processo regulatório de remodelamento (32,33).

O epitélio da via aérea, até então considerado como mais um compartimento afetado no quadro asmático, desenvolve, na verdade, um importante papel como uma barreira primária ativa contra microorganismos e toxinas, além de regular funções metabólicas e imunológicas das vias aéreas,

modulando uma série de eventos inflamatórios e do remodelamento, através da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (23,24,31).

Modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica, em camundongos, descrevem modificações na estrutura do epitélio brônquico, bem como na produção de muco (12,13,22,23). O papel das IL-4 e IL-13 no epitélio tem sido exaustivamente investigado, não somente por suas múltiplas atividades junto às células inflamatórias, mas também devido ao seu efeito estimulatório na síntese de óxido nítrico, eotaxinas e fatores de crescimento pelas células epiteliais (34-36).

Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm sugerido que tais mediadores podem ser liberados de várias fontes, inclusive de células inflamatórias, do músculo liso, do epitélio brônquico e por proteínas da matriz extracelular (37-40). Corroborando com estes dados, tem sido demonstrado que mastócitos e outras células inflamatórias podem infiltrar-se na musculatura lisa dos brônquios, liberando produtos que estão diretamente relacionados à hiperresponsividade brônquica (37-40).

1.1.5 Hiperresponsividade brônquica

Uma das anormalidades funcionais mais características da asma é a hiperresponsividade, que pode ser desencadeada não somente por

alérgenos, mas também por outros estímulos inespecíficos, tais como poluição atmosférica, exercício físico, estimulantes farmacológicos, infecções respiratórias e fatores emocionais (41,42).

Alguns mecanismos podem estar relacionados com a hiperresponsividade brônquica, tais como: contratura excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, espessura e integridade da camada epitelial, alterações mecânicas dos brônquios, modificações no conteúdo e no equilíbrio das proteínas da matriz extracelular e ainda regulação autonômica exacerbada (43,44).

Todavia, a parcela de participação de cada um desses fatores ainda não está totalmente estabelecida. O processo inflamatório, com a liberação de uma vasta gama de mediadores inflamatórios e citocinas, têm um papel chave na hiperresponsividade, bem como a intensidade da fibrose subepitelial e a específica infiltração de mastócitos no músculo liso (41-44).

Neste sentido, muitos estudos têm sugerido que não somente a inflamação, mas também o remodelamento contribui de maneira significativa para o desenvolvimento da hiperresponsividade brônquica.

Por outro lado, há estudos, como o de Brackel e colaboradores, nos quais a discussão gira em torno do efeito rijo que o remodelamento pode

causar na via aérea e nas propriedades dinâmicas de sua parede, resultando em uma baixa complacência frente ao estímulo (28).

1.2 Efeitos pulmonares do tabagismo

O tabagismo é certamente um fator de risco importante para diversas doenças prevalentes atualmente, como por exemplo o câncer de pulmão, que, por sua vez, é o maior responsável pela mortalidade por tumores malignos em homens e a segunda causa de morte em mulheres no Brasil (45). Cerca de 15% dos tabagistas desenvolvem, ao longo dos anos, doença pulmonar obstrutiva crônica (46).

Mais recentemente, atenção especial tem sido focada sobre os efeitos do tabagismo sobre a saúde dos então chamados fumantes passivos (**E**nvironmental **T**obacco **S**moke, **ETS**). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o fumo passivo – ETS - pode causar câncer, doenças respiratórias e também agravamento da resposta alérgica daqueles indivíduos já portadores de algum tipo de distúrbio pulmonar (47-50). Entretanto, a diversidade de fatores ambientais que efetivamente afetam os seres humanos pode dificultar a análise real do impacto do ETS sobre a prevalência e severidade de processos alérgicos (51).

1.2.1 Tabagismo e asma

Estudos prévios têm demonstrado que a exposição prolongada à fumaça do cigarro pode ser muito mais irritativa em indivíduos asmáticos quando comparada a indivíduos não-asimáticos, provavelmente devido à amplificação do processo inflamatório. Além disso, a fumaça de cigarro pode potencializar a diminuição e declínio acelerados da função pulmonar, bem como uma sintomatologia exacerbada em indivíduos já sensibilizados (48-50).

Além disso, o tabagismo diminui a eficácia terapêutica dos corticoesteróides em pacientes asmáticos. A gravidade da asma tem forte e direta correlação com o tabagismo e, alguns estudos sugerem até um risco de aumento de asma brônquica em pessoas que fumaram por 3 anos ou mais (49,51-53).

Dados epidemiológicos demonstram que adolescentes fumantes devem demonstrar um risco aumentado de desenvolver asma, embora tenha-se poucas informações concernentes ao efeito do tabagismo ativo em adolescentes já sensibilizados a algum tipo de alérgeno (47-49, 51-53).

Todavia, apesar de extensivamente descritos, os efeitos deletérios do tabagismo sobre o sistema pulmonar ainda permanecem obscuros em uma situação de inflamação alérgica crônica preexistente nos pulmões (52-54).

A dimensão da complexidade da interação asma-cigarro apresenta tantos desafios como controvérsias. Alguns estudos experimentais demonstram que o cigarro contém propriedades antiinflamatórias, agindo como um fator de inibição da infiltração eosinofílica presente no quadro asmático (54-57). Outros, por sua vez, mostram que todas as características da asma - inflamação típica com resposta predominante Th2, hiperresponsividade e remodelamento pulmonar - evoluem de maneira simultânea e concorrem para um agravamento do quadro fisiopatológico (47-49).

A despeito das divergências, a maioria das pesquisas realizadas concentrou-se na análise isolada de um dos elementos envolvidos, seja a sensibilização, o processo inflamatório, o remodelamento pulmonar e/ou a resposta brônquica exacerbada, nesta situação de dupla agressão ao sistema respiratório (49-51,54-57), havendo necessidade de estudos que avaliem mais globalmente a relação entre exposição ao cigarro e inflamação alérgica.

1.3 Modelos experimentais de asma e tabagismo

1.3.1 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 a alérgenos, como a ovoalbumina (OVA) (58). 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 (58).

Diante destes obstáculos, observa-se hoje o uso crescente de camundongos, por apresentar menor custo de manutenção em biotério, disponibilidade de reagentes, anticorpos e possibilidades do uso de técnicas laboratoriais sofisticadas (por exemplo, citometria de fluxo e imunohistoquímica), além da possibilidade de manipulação genética nos animais para produção de transgênicos (59).

Com o objetivo de provocar hiperresponsividade das vias aéreas, inflamação eosinofílica pulmonar e elevados títulos de IgE, vários protocolos com diferentes rotas de administração, antígenos e adjuvantes são utilizados nos modelos experimentais, a fim de simular com maior proximidade possível as características da doença em humanos (60).

Apesar dos camundongos serem amplamente utilizados nos modelos experimentais de inflamação pulmonar alérgica crônica, algumas diferenças devem ser consideradas quando da comparação com a condição clínica, como a transitoriedade ou ausência de aumento de contratatura da musculatura lisa das vias aéreas - que nos humanos é persistente –, a

pouca duração da atividade inflamatória e as distintas anatomia e função eosinofílica (60).

Takeda e colaboradores 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 hiperresponsividade à metacolina, possivelmente por causa da diferença de distribuição de eosinófilos. Nos animais Balb/c há eosinófilos predominantemente em paredes de vias aéreas, produzindo resposta mecânica de maior intensidade quando expostos à metacolina, enquanto que nos C57Bl/6, o mesmo fenômeno se apresenta difuso e com menor reação ao agonista colinérgico (61-63).

Com a devida transposição de todas estas diferenças e limitações, os estudos desenvolvidos com camundongos apresentam características semelhantes à doença clínica, e são bastante úteis para teste de novos agentes terapêuticos.

1.3.2 Modelos experimentais de tabagismo

Com o objetivo de obter uma melhor compreensão do desenvolvimento e das implicações fisiopatológicas do tabagismo e da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), diversos modelos experimentais foram desenvolvidos em várias espécies.

Muitos modelos de DPOC, induzida pela fumaça de cigarro, já foram criados usando cães, cobaias, coelhos, ratos e camundongos (63). A exemplo dos modelos de inflamação pulmonar alérgica crônica, aqueles que utilizam camundongos nos estudos de DPOC parecem ser particularmente interessantes, pois permitem a análise dos mecanismos envolvidos através da disponibilidade de citocinas e do uso de linhagens geneticamente modificadas para a avaliação do desenrolar da doença em condições biológicas distintas.

Os modelos experimentais de exposição à fumaça de cigarro demonstram que os camundongos suportam bem este tipo de procedimento por aproximadamente 12 meses, tolerando níveis de carboxihemoglobina que variam entre 10-14% (62,63).

Entretanto, deve-se ponderar que uma das limitações desses modelos está relacionada à sua reprodutibilidade, devido à diversidade de tipos de câmaras e à necessidade de adequada e constante monitorização da concentração de fumaça.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar e correlacionar o efeito da exposição de curta duração à fumaça de cigarro sobre a inflamação, responsividade e remodelamento pulmonares, em um modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica em camundongos Balb/c.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se, neste modelo experimental, curtos períodos de exposição à fumaça de cigarro alteram de maneira diferenciada as características da inflamação pulmonar alérgica crônica.
- Explorar possíveis mecanismos de correlação entre os processos de remodelamento, inflamação e responsividade pulmonar após a coexposição ao alérgeno e fumaça de cigarro.
- Correlacionar os achados celulares ao comportamento mecânico dos pulmões observado neste modelo.

3 MÉTODOS

Comissão de Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 1120/07.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, adultos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando aproximadamente 20-25g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-25°), luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro) e 70% de umidade relativa. A alimentação constou de ração (Purina Labina[®], São Paulo, Brasil) e água “*ad libitum*”.

3.2 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em grupos, de acordo com os critérios de sensibilização e indução da inflamação pulmonar crônica e/ou segundo a exposição à fumaça de cigarro.

O protocolo experimental contou com 4 grupos, assim divididos:

- 1) Grupo Controle (n=8): Animais expostos à inalação de soro fisiológico (NaCl 0,9%) 3 vezes por semana, durante 30 minutos.
- 2) Grupo Fumo (n=7): Animais expostos à inalação de soro fisiológico 3 vezes por semana, durante 30 minutos, e à fumaça de cigarro, 5 vezes por semana, durante o mesmo período.
- 3) Grupo OVA (n=7): Animais previamente sensibilizados com 50 µg de ovoalbumina (OVA), expostos à inalação de OVA 1% diluída em soro fisiológico, 3 vezes por semana, durante 30 minutos.
- 4) Grupo OVA + Fumo (OF) (n=9): Animais previamente sensibilizados com 50 µg de ovoalbumina (OVA), expostos à inalação de OVA 1% diluída em soro fisiológico, 3 vezes por semana, durante 30 minutos, e à fumaça de cigarro, 5 vezes por semana, durante o mesmo período.

3.2.1 Sensibilização dos animais

Foram realizadas 3 administrações intraperitoneais (i.p) de OVA (Advanced Nutrition Ltda., Brasil) com 6 mg de hidróxido de alumínio (Pepsamar, Sanofi-Synthelabo S.A., Brasil), diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%) em um volume total de 0,2 mL/animal, nos dias 0, 14 e 28. A partir do 21º dia do experimento, foram iniciadas as inalações de OVA 1% diluída em soro fisiológico, realizadas 3 vezes por semana, por 30 minutos em cada sessão, até o dia 42, bem como as exposições à fumaça de cigarro, por 5 vezes por semana, pelo mesmo período de tempo.

Para a realização da inalação de animais, os camundongos foram colocados em uma caixa de acrílico (30 x 15 x 20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (modelo Pulmoclear II Luxo, marca Soniclear®, São Paulo, Brasil). Os animais não sensibilizados foram inalados com soro fisiológico.

Figura 1 – Esquema do protocolo experimental

3.2.2 Método de exposição à fumaça de cigarro

O protocolo de exposição à fumaça de cigarro foi realizado 5 dias por semana, durante 3 semanas. Os animais expostos à fumaça de cigarro (grupos Fumo e OF) eram mantidos na caixa de exposição durante 30 minutos.

A exposição foi realizada em uma caixa de plástico de 28 l (Figura 2) (aproximadamente 40 x 27 cm na base, com altura de 26 cm), no interior de uma capela. O interior da caixa foi dividido ao meio por uma tela de metal para a manutenção dos grupos de camundongos separados, quando necessário. Na parte superior, foi introduzido um pequeno ventilador para homogeneizar o ar no interior da caixa. Havia uma saída de ar e duas entradas: uma para ar sintético e outra para fumaça de cigarro.

O fluxo na entrada de ar sintético foi controlado por um fluxômetro conectado a um torpedo de ar comprimido e foi mantido em 1,5-2 l/min. A segunda entrada da caixa recebia uma mistura de ar sintético e fumaça de cigarro, que foi aspirada por um sistema de Venturi conectado a um cigarro aceso. O fluxo laminar de ar sintético, passando por uma região de menor diâmetro, foi acelerado, com consequente redução da pressão neste ponto (efeito Venturi), permitindo a aspiração da fumaça do cigarro.

A redução na pressão que ocorre no ponto de redução do diâmetro do tubo é dependente do fluxo de ar mantido. Deste modo, com o controle do

fluxo de ar sintético na segunda entrada, a quantidade de fumaça de cigarro que foi aspirada para a tubulação e enviada para o interior da caixa foi igualmente supervisionada. Isto permitia regular a concentração de monóxido de carbono (CO) mantida na caixa, medida por um sensor de CO (Toxi/Oxy Pro, Biosystems, Connecticut, EUA).

Figura 2 – Esquema ilustrativo da caixa de exposição

Após alguns testes iniciais, foi determinado que o fluxo fixo de ar sintético na segunda entrada seria de aproximadamente em 1,5 l/min, devido à concentração de CO que variava entre 300 e 350 ppm. Os cigarros utilizados foram da marca Derby (maço vermelho) (Souza Cruz), cuja composição é aqui apresentada (Tabela 1).

Os cigarros foram colocados em uma tubulação ligada a parte lateral do Venturi, para que a fumaça fosse aspirada. Em cada dia de exposição, cerca de 10-12 cigarros eram consumidos durante 30 minutos.

Tabela 1 – Composição do cigarro da marca Derby, Souza Cruz

Componentes	Concentração
Alcatrão	10 mg/cigarro
Nicotina	0,8 mg/cigarro
Monóxido de carbono	10 mg/cigarro

Os níveis de carboxi-hemoglobina não foram monitorados em todos os animais do experimento, já que para tanto foi preciso coletar grande alíquota de sangue. A carboxi-hemoglobina foi dosada em animais separados, submetidos ao mesmo protocolo: 30 minutos de exposição na caixa, mantendo-se concentrações de CO entre 300 e 350 ppm. Nesses animais, os níveis de carboxi-hemoglobina foram de aproximadamente 10%.

3.3 Avaliação da mecânica respiratória

As medidas de mecânica do sistema respiratório foram realizadas 48 horas após o último desafio antigênico, e tanto a responsividade como a sensibilidade brônquica foram avaliadas através da realização da curva dose-resposta para metacolina (Mch).

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico (50 mg/kg, por via intraperitoneal), traqueostomizados com uma cânula metálica 18G e conectados a um ventilador para pequenos animais (flexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá). Um diagrama esquemático do ventilador mecânico utilizado é apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Diagrama esquemático do flexiVent

Os animais foram ventilados com um volume corrente de 20 mL/kg e frequência respiratória de 120 ciclos/minuto. Após 1 minuto de ventilação mecânica, foi induzida paralisia muscular através de injeção intraperitoneal de brometo de pancurônio (1 mg/kg). Antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões foram insuflados até uma pressão de 40 cmH₂O, a fim de homogeneizar o histórico pulmonar. Para o cálculo da impedância do sistema respiratório (Z_{rs}), foi utilizado um sinal de perturbação em volume de 16 segundos. A ventilação mecânica foi interrompida apenas

para a aplicação das perturbações em volume; em seguida foi realizada a coleta dos dados basais.

Foram coletados a posição do pistão (V_{cyl}) e a pressão interna do cilindro (P_{cyl}) durante os 16 segundos de perturbação, composta por uma soma de senóides com frequências primas que vão de 0,25 a 19,625 Hz, evitando, assim, distorção harmônica. As amplitudes das senóides decrescem hiperbolicamente com a frequência. A perturbação em volume teve uma amplitude máxima de 10 mL/kg. Para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando as perdas, devido à compressibilidade dos gases. V_{cyl} foi corrigido a fim de obter o volume que efetivamente chegou ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido também, resultando no valor de P_{ao} , pressão na abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de V , obteve-se o fluxo ($\dot{V}$). Para análise das impedâncias obtidas, utilizou-se o modelo de fase constante, descrito por Hantos e colaboradores (64):

$$Z_{rs}(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G_{tis} - i \cdot H_{tis}}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha} \quad (1)$$

onde R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inércia, G_{tis} caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H_{tis} caracteriza a energia acumulada no tecido do pulmão, i é a unidade imaginária, f é a frequência e

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right) \quad (2)$$

Foram calculados os valores basais e após cada dose de metacolina de G_{tis} , H_{tis} e R_{aw} .

3.3.1 Curva dose-resposta à metacolina

O broncoespasmo foi induzido através da inalação de metacolina diluída em soro fisiológico em concentrações crescentes de 6, 12, 25 e 50 mg/mL, nebulizada por um inalador ultra-sônico (Respira Max, NS, LTDA, Brazil, com frequência ultra sônica de 1,7 MHz) durante 1 minuto. A coleta dos dados de mecânica respiratória foi realizada 30 segundos após o término da inalação. Houve um intervalo de 3 minutos entre uma dose e outra.

3.4 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Após a realização da curva dose-reposta, procedeu-se à coleta de sangue e do LBA. Os pulmões foram lavados com 1,5 mL (3 x 0,5 mL) de solução salina fosfatada (PBS) e 1,0 mL de LBA foi recuperado. Este volume foi então centrifugado (1000 rpm, durante 10 minutos) a 5°C, e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C para análises futuras. O botão celular foi ressuspendido em 500 µL de soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) e utilizado para avaliação do número de células total e diferencial. A contagem do número total de células foi realizada na Câmara de Neubauer, enquanto a contagem diferencial contou com a fixação em lâminas com o corante Diff Quick, num total de 300 células por lâmina.

3.5 Avaliação do título de IgE total

O título de IgE total foi mensurado através do método ELISA, utilizando-se um kit apropriado, de acordo com as instruções do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA).

3.6 Histoquímica e Imunohistoquímica

Imediatamente após a coleta do LBA e do sangue, os animais foram sacrificados por dissecação da aorta abdominal. A caixa torácica foi aberta e o sistema cardiopulmonar em bloco foi retirado e colocado em formol 10% durante 24 horas. Após este período, os pulmões foram cortados no seu maior eixo e submetidos ao processamento histológico de rotina.

3.6.1 Histoquímica

As lâminas contendo cortes histológicos de 5 µm foram submetidas à coloração denominada Picrossírius (PS), utilizada para a avaliação da densidade de fibras colágenas nas vias aéreas, nos vasos e no parênquima pulmonar (este último não realizado neste estudo) (27,65).

3.6.2 Imunohistoquímica

As lâminas previamente preparadas com 3- Aminopropil-trietoxisilano (Silane – Sigma), contendo os cortes histológicos dos pulmões, foram inicialmente desparafinadas, hidratadas e submetidas aos seguintes procedimentos:

Etapa 1 – Recuperação antigênica: realizada através da Proteinase K por 20 minutos (37°C), seguidos de descanso por mais 20 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS.

Etapa 2 – Bloqueio e Incubação com Anticorpo Primário: O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% (3x10 minutos), seguidos de incubação com os anticorpos primários anti-IL-4 (sc-1260; Santa Cruz), anti IL-5 (sc-7885; Santa Cruz), anti INF- γ (sc-8308; Santa Cruz), anti IL-10 (sc-1783; Santa Cruz), anti MMP9 (sc-6840; Santa Cruz) e anti TGF- β (sc-146; Santa Cruz), na proporção de 1:500 para IL-4 diluído em BSA, 1:200 para IL-5 diluído em BSA, 1:300 para INF- γ diluído em citrato pH 6, 1:300 para IL-10 diluído em citrato, 1:300 para MMP9 diluído em Tris-EDTA pH 9 e 1:400 para TGF- β diluído em tripsina, os quais foram aplicados sobre os cortes relativos ao experimento e também aos controles (positivo e negativo) de tecido, bem como às lâminas incubadas “overnight” .

Etapa 3 – Incubação com Anticorpo Secundário e Complexo: As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABCKit Vectasain (Vector Elite – PK-6105 (antigoat) / PK6101 (anti-rabbit). Apenas para o anticorpo primário anti IL-4, após a incubação seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10V3% + metanol (1:1) (2x10 minutos) e, posteriormente, incubação com o complexo.

Etapa 4 – Revelação: Seguiu-se com a lavagem das lâminas em PBS e revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (*Sigma Chemical Co*, Saint Louis, Missouri, EUA).

Etapa 5 – Contra-Coloração e Montagem das Lâminas: As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.7 Análise morfométrica dos pulmões

Para o estudo do conteúdo de fibras colágenas, foram selecionados 5 campos para cada animal, mediante o mapeamento da lâmina e, com uma câmera JVC acoplada a um microscópio (Leica, modelo DMR, Alemanha)

em um aumento de 200x, as imagens foram captadas e armazenadas em um microcomputador. Cada campo correspondia a uma via aérea e sua estrutura vascular adjacente. Através do programa de análise de imagens (Image Pro Plus, versão 4.5.0.29, Media Cybernetics, Inc.), foram determinadas por escalas de marcação de cores as áreas coradas com PS.

A área brônquica correspondia ao limite que tange a membrana basal até o início da adventícia, enquanto a área de interesse perivascular limitava-se entre o perímetro externo do vaso até a adventícia. Uma vez que não foi possível distinguir claramente a origem das fibras no espaço peribroncovascular, foi realizada uma medida alternativa da seguinte maneira: foram calculados $\frac{3}{4}$ da via aérea e $\frac{3}{4}$ da estrutura vascular separadamente, tanto sua área total, como sua área corada com PS (colágeno). O espaço entre o brônquio e o vaso foi denominado espaço peribroncovascular, constituído por $\frac{1}{4}$ restante das áreas vascular e peribrônquica.

Com uma câmera digital (Axiocam MRc5, model 0450-354, Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) em um aumento de 400x, a avaliação das células positivas para IL-4, IL-5, INF- γ e MMP9 foi realizada com o mesmo procedimento acima descrito. A análise das células positivas para TGF- β e IL-10 foi focada no epitélio brônquico (aumento de 400x). Todos os resultados foram expressos em $\mu^2\text{m}/\mu\text{m}$ ($=\mu\text{m}$) (área corrigida pelo comprimento do compartimento correspondente).

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados através do software Sigma Stat 3.5 (Califórnia, EUA, 2005). A distribuição da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas ao teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste One-Way ANOVA on Ranks seguido pelo teste de Dunn's para comparação entre os grupos. O teste-T foi utilizado para análises múltiplas entre dois grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0,05$).

Para averiguar o nível de correlação entre as variáveis TGF- β /colágeno e o número de eosinófilos no LBA/Htis do grupo OF, foi realizado o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, que assume valores entre -1 e 1 (valor de máxima correlação, negativa ou positiva, respectivamente). Vale ressaltar que os dados comparados pertencem aos mesmos animais para cada parâmetro analisado.

4 RESULTADOS

4.1 Mecânica pulmonar

A resistência das vias aéreas (Raw), resistência dos tecidos (Gtis) e elastância (Htis) foram medidas de acordo com o modelo de fase constante durante a avaliação da responsividade pulmonar, realizada pela administração de doses crescentes de metacolina inalatória (6, 12, 25 e 50 mg/mL) (Figuras 4, 5 e 6).

Não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de Raw e Gtis em nenhum momento da curva dose-resposta. Entretanto, na análise de Htis, pôde-se observar que o grupo exposto somente à OVA apresentou aumento estatisticamente significativo na situação basal e nas doses de 6 e 25 mg/mL ($p < 0,05$) quando comparados os grupos Fumo e Controle.

O grupo OVA apresentou um aumento de 17% em Htis, em relação aos grupos Controle e Fumo na situação basal, e nas doses de 6 e 25 mg/mL, a diferença foi de 20% e 30%, respectivamente. Quando comparados os grupos OVA e OF na dose de 25 mg/mL, uma diferença não estatisticamente significativa foi revelada ($p = 0,059$).

Figura 4 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e ovoalbumina (OVA) na responsividade brônquica para Raw; OF, grupo que foi exposto à OVA e ao fumo. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhuma dose de Mch ($p > 0,05$)

Figura 5 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA na responsividade brônquica para Gtis. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhuma dose de Mch ($p > 0,05$)

Figura 6 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA na responsividade brônquica para Htis. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Controle e Fumo.

4.2 IgE e lavado broncoalveolar

4.2.1 IgE

O nível sérico de IgE foi quantificado ao final do estudo (Figura 7). Houve um aumento estatisticamente significativo em ambos os grupos sensibilizados (OVA e OF) quando comparados aos grupos Controle e Fumo ($p < 0,05$). Nota-se que a exposição à fumaça de cigarro, por si, não alterou os níveis de IgE total.

4.2.2 Lavado Broncoalveolar (LBA)

A inflamação pulmonar foi avaliada através da quantificação de células no LBA (Figuras 8 a 12). A coexposição à OVA e fumaça de cigarro não aumentou o número total e específico de células no LBA.

O grupo OVA apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos demais grupos tanto na contagem total como na específica para cada tipo celular. Quando analisado o conteúdo eosinofílico (Figura 9), duas particularidades foram notadas, a saber: 1) a coexposição à OVA e fumaça de cigarro reduziu o número de eosinófilos em aproximadamente 20 vezes, quando comparada ao grupo OVA ($p < 0,05$) e 2)

houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos Fumo e OF ($p < 0,05$).

Quando analisados os dados de Htis (na dose de 25 mg/mL de metacolina) e o número total de eosinófilos do grupo OF, houve uma forte correlação positiva entre estes fatores ($r = 0,9$; $p = 0,015$).

Figura 7 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre os níveis séricos de IgE. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$, $p < 0,001$ comparado, respectivamente, aos grupos Controle e Fumo

Figura 8 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número total de células no LBA. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos outros três grupos experimentais

Figura 9 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de eosinófilos no LBA. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos outros três grupos experimentais; ** $p < 0,05$ comparado ao grupo Fumo

Figura 10 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de neutrófilos no LBA. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos outros grupos experimentais

Figura 11 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de linfócitos no LBA. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos outros três grupos experimentais

Figura 12 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre o número de macrófagos no LBA. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos outros três grupos experimentais

4.3 Expressão celular para respostas Th1 e Th2

A expressão celular para respostas caracterizadas como Th1 e Th2 é descrita a seguir. As figuras 13 e 14 mostram a densidade das células inflamatórias positivas para IL-4 e IL-5 na região peribroncovascular, respectivamente.

O grupo OVA apresentou um aumento significativo de células positivas para IL-4 quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$) e uma diferença marginal foi observada quando os grupos OVA e OF foram comparados ($p=0,06$). Apesar de apresentar padrão gráfico similar, não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre nenhum grupo de células positivas para IL-5.

A figura 15 mostra a densidade das células positivas para INF- γ , com diferença estatisticamente significativa quando o grupo OVA é comparado aos grupos Controle e OF ($p < 0,05$). Os painéis de fotomicrografias, representados pelas figuras 16 e 17, exemplificam os resultados obtidos da densidade de células inflamatórias peribroncovasculares positivas para IL-4 e INF- γ , respectivamente (aumento de 400x).

A expressão de células positivas para IL-10 no epitélio brônquico mostrou diferença estatisticamente significativa quando os grupos Fumo e OF foram comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$), como demonstrado na figura 18.

Figura 13 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células inflamatórias peribroncovasculares positivas para IL-4. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle

Figura 14 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células inflamatórias peribroncovasculares positivas para IL-5. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais

Figura 15 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células inflamatórias peribroncovasculares positivas para INF- γ . Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Controle e OF

Figuras 16 e 17 – Painéis de fotomicrografias de células positivas para IL-4 e INF- γ , respectivamente. B)Controle; C)Fumo; D)OVA; E)OVA+Fumo

Figura 18 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células epiteliais positivas para IL-10. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos grupo Controle

4.4 Remodelamento pulmonar

O remodelamento pulmonar neste estudo foi avaliado pela proporção de fibras colágenas e de células positivas para MMP9 no compartimento peribroncovascular. A análise de células TGF- β positivas foi realizada no epitélio brônquico.

O grupo OF mostrou um aumento significativo no conteúdo de fibras colágenas no compartimento peribroncovascular quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 19). Comparado ao grupo Controle, o grupo OF apresentou um aumento de 80% no conteúdo de fibras colágenas, e quando comparado ao grupo OVA, este valor foi de 42%. A figura 20 mostra os resultados obtidos da análise do conteúdo de fibras colágenas.

A figura 21 demonstra a densidade das células positivas para MMP-9. Os grupos OVA e OF apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo Controle. Na avaliação de células positivas para TGF- β no epitélio brônquico, o grupo OF apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos Controle e Fumo (Figura 22).

Quando analisados os dados do conteúdo de colágeno e de expressão celular para TGF- β do grupo OF, estas variáveis apresentaram uma forte correlação ($r=0,91$; $p=0,01$).

Figura 19 – A coexposição à OVA e fumaça de cigarro aumentou a densidade de fibras colágenas no espaço peribroncovascular. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos experimentais

Figura 20 – Painele de fotomicrografias do conteúdo de fibras colágenas peribroncovasculares. B)Controle; C)Fumo; D)OVA; E)OVA+Fumo

Figura 21 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células MMP9 positivas do compartimento peribroncovascular. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. Houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos OVA e OF são comparados ao grupo Controle. * $p < 0,05$

Figura 22 – Efeitos da exposição e coexposição à fumaça de cigarro e OVA sobre as células epiteliais TGF-β positivas. Os valores estão expressos como médias dos grupos, e as barras representam o desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Controle e Fumo

5 DISCUSSÃO

As consequências deletérias advindas da exposição prolongada ao cigarro, tais como alterações cardiovasculares, muitos tipos de câncer e várias desordens respiratórias, incluindo a DPOC, estão extensivamente descritas na literatura corrente (66-68).

Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos da exposição à fumaça de cigarro de curta duração, especialmente se conjugados às características clássicas de inflamação pulmonar alérgica crônica em pulmões previamente sensibilizados.

5.1 Hiperresponsividade pulmonar

Uma vez analisados os resultados de responsividade pulmonar, observou-se um aumento significativo somente no grupo OVA no parâmetro de Htis na situação basal e nas doses de 6 e 25 mg/mL de metacolina (Figura 6).

Algumas evidências têm emergido para aclarar aspectos da resposta constritora semelhante a esta nos modelos de coexposição ao alérgeno e à

fumaça de cigarro. Uma hipótese a ser considerada nos resultados de mecânica pulmonar diz respeito à rota de administração do agonista.

Peták e colaboradores estudaram os efeitos da administração de metacolina inalatória e intravenosa em ratos, através de medidas de mecânica oscilatória (69). A análise da responsividade pulmonar destes animais revelou que o padrão de alteração mecânica nas vias aéreas e no parênquima dependia do local de ação da metacolina, que por sua vez estava intimamente relacionado à sua forma de administração.

Enquanto a infusão intravenosa induzia somente broncoconstrição, a versão aerossol foi capaz de evocar constrição tanto de tecido como de via aérea (69). Este fenômeno, segundo os autores, decorre da presença e atividade diferencial de receptores muscarínicos (colinérgicos) do tipo M3 - no músculo liso das vias aéreas - e M1, localizados nas paredes alveolares.

Os receptores M3, responsáveis por respostas constritoras de vias aéreas, parecem ser mais facilmente ativados pela infusão venosa de metacolina, enquanto o agonista aerossol necessita ser difundido através do epitélio respiratório antes de atingir o músculo.

Já os receptores M1, localizados nas paredes dos alvéolos e envolvidos nas respostas do parênquima, são alcançados sem obstáculos pela via inalatória (69). Estes fatos podem explicar, parcialmente, os resultados obtidos no presente estudo.

Uma outra perspectiva para o comportamento mecânico obtido neste trabalho pode estar relacionada à diminuição geral do número das células inflamatórias no LBA observada no grupo OF (Figuras 8-12).

A baixa resposta mecânica dos animais expostos ao alérgeno e à fumaça de cigarro durante a provocação com metacolina poderia, também, ser influenciada pela queda do número de eosinófilos neste grupo OF, uma vez que é bem conhecida a relação entre acúmulo eosinofílico e hiperresponsividade brônquica (70-72). Neste sentido, há um reforço adicional advindo de uma marcada correlação estatística entre estas variáveis ($r=0,90$) na dose de 25 mg/mL.

5.2 Resposta imune

Apesar das conhecidas características imunomodulatórias do cigarro (73), esse efeito na asma não está bem determinado.

Durante o desenvolvimento da imunidade adaptativa, as células dendríticas desempenham um importante papel na diferenciação dos linfócitos Th1 e Th2. Estudos prévios têm mostrado poucas células dendríticas e linfócitos B maduros em pacientes asmáticos que fumam, com conseqüente alteração do equilíbrio da expressão das citocinas dos tipos Th1 e Th2 (56,57).

Os efeitos da exposição de curta duração à fumaça de cigarro, sobre a inflamação pulmonar alérgica crônica, neste estudo, mostraram-se inibitórios na expressão celular de citocinas do tipo Th1 e Th2.

A expressão celular, no espaço peribroncovascular, para IL-4, mostrou que o grupo OVA apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo Controle, e não significativo ($p=0,06$) se comparado ao grupo OF (Figuras 13 e 16). Apesar de apresentar um padrão gráfico similar, a expressão de células positivas para IL-5 não mostrou diferença alguma entre os grupos (Figura 14). Estes dados corroboram os resultados obtidos por Melgert e colaboradores, em modelo experimental similar ao aplicado neste trabalho, que encontraram uma atenuação da inflamação pulmonar em animais previamente sensibilizados expostos à fumaça de cigarro (55).

De maneira semelhante, este estudo apresentou um aumento estatisticamente significativo na expressão de $\text{INF-}\gamma$ do grupo OVA, quando comparado aos grupos Controle e OF (Figuras 15 e 17).

Tsoumakidou e colaboradores, analisando os efeitos do cigarro sobre a imunidade de pacientes asmáticos, demonstraram uma tendência de redução da expressão de citocinas do tipo Th1, ratificando os resultados de estudos *in vitro*, que mostraram a inibição da polarização para resposta Th1 mediada pelas células dendríticas, causada pela exposição à fumaça de

cigarro (74,75). Tais achados podem endossar observações clínicas relativas à maior susceptibilidade a infecções dos pacientes tabagistas (56,57,74-77).

Como mencionado anteriormente, dentre os componentes mais abundantes e reativos da fumaça de cigarro está a acroleína (78). Um dos mecanismos em potencial, pelo qual a acroleína pode suprimir a produção de $\text{INF-}\gamma$, está relacionado ao aumento de IL-10, uma citocina com características regulatórias e anti-inflamatórias (78,79).

A IL-10, influenciada pela acroleína, é capaz de inibir a apresentação do antígeno pelos monócitos/macrófagos, abolindo respostas proliferativas e com consequente queda nos níveis de citocinas pelos linfócitos T (78,79). Este mecanismo pode estar envolvido nos resultados demonstrados neste estudo, uma vez que os animais submetidos à fumaça de cigarro apresentaram maior expressão de IL-10 no epitélio brônquico (Figura 18).

Outra possibilidade que pode ser explorada, para explicar a aparente atenuação dos efeitos pró-inflamatórios causados pela curta exposição à fumaça de cigarro na asma, é a presença de elementos que desempenham papel “protetor” na inflamação, tais como a óxido nítrico sintase e a hemo-oxigenase-1 (HO-1) (80-82).

Estas enzimas produzem óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO), respectivamente, que desenvolvem um papel inibitório na inflamação

pulmonar alérgica (32,33,55,80-82). Tanto a óxido nítrico sintase como a hemo-oxigenase apresentam-se elevadas após a exposição à fumaça de cigarro, e em conjunto ou de maneira isolada, podem ser responsáveis pelo efeito inibitório sobre a inflamação pulmonar, como sugerido por Chang e colaboradores (82).

5.3 Remodelamento pulmonar

Em alguns modelos animais, a deposição de componentes da matriz extra celular - tais como colágeno ou fibronectina - após exposições repetidas a um alérgeno, parece estar associada à atenuação da contração do músculo liso das vias aéreas, atribuída ao enrijecimento das mesmas (83).

Estudos *pós-mortem* demonstram que a camada de músculo liso das vias aéreas de pacientes asmáticos está aumentada (84-86), podendo resultar em hiperresponsividade brônquica se a contratilidade das células permanecer constante (86,87). No entanto, este espessamento é atribuído, em parte, à deposição de matriz extra-celular ao redor das células do músculo liso, que pode atuar no sentido contrário ao encurtamento muscular (87,88).

Em estudo clínico, Brackel e colaboradores, investigando as propriedades mecânicas das vias aéreas através de um balão esofágico acoplado a um transdutor, obtiveram e compararam valores de áreas e curvas de pressão transmural durante a expiração forçada (28).

Foi observado, então, que a complacência brônquica foi significativamente menor nos indivíduos asmáticos de longa data do que nos saudáveis. Apesar da ausência de biópsia brônquica, os autores sugerem que o remodelamento pode ter resultado em um enrijecimento dinâmico das propriedades elásticas da parede das vias aéreas (28).

Além do remodelamento relacionado à inflamação pulmonar alérgica crônica, há aquele advindo da exposição à fumaça de cigarro, mesmo de curta duração, como demonstrado por Churg e colaboradores (89).

Após expor camundongos à fumaça de cigarro por diferentes períodos (2h, 6h, 24h, 1 semana, 1 mês e 6 meses), foi observado que após 2h já era possível notar um aumento de aproximadamente 6 vezes na expressão dos níveis de pró-colágeno I, que declinou após 24h.

Nos períodos de 1 mês e 6 meses, o aumento girou em torno de 8 vezes, além das análises da expressão de TGF- β e fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF), apresentarem atividade similar (89).

Neste estudo, semelhantemente, foi observado um aumento significativo no conteúdo de colágeno peribroncovascular e na expressão

celular positiva para TGF- β no grupo OF (Figuras 19, 20 e 22), que pode ser atribuído à agressão ao sistema respiratório provocada pela inflamação e exposição à fumaça de cigarro.

No entanto, tais achados devem ser interpretados cuidadosamente, uma vez que somente a expressão celular pode não corresponder a alterações protéicas, ou mesmo o processamento da proteína pode ser complexo e envolver outras alças regulatórias, como é o caso do TGF- β (89).

No caso deste estudo, em particular, após análise das variáveis medidas, foi observada uma forte correlação entre o conteúdo de colágeno e a expressão de TGF- β ($r=0,91$).

A deposição de colágeno é controlada pelo equilíbrio entre as metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores (TIMP's). Dentre as metaloproteinases, a MMP9 foi a primeira a ser estudada em profundidade devido à sua implicação na fisiopatologia da asma (23).

A fumaça de cigarro, que contém vários componentes irritantes, também pode apresentar correlação com os níveis de MMP9. Dentre os elementos mais potentes oriundos da fumaça de cigarro está a acroleína, um dos produtos do estresse oxidativo (78).

Exposições repetidas à acroleína são acompanhadas de aumento nos níveis de MMP9, como demonstrado por Deshmukh e colaboradores, utilizando animais geneticamente modificados para MMP9 (90).

Os camundongos, MMP9^(-/-) ou MMP9^(+/+), foram expostos ao ar filtrado ou à acroleína numa concentração de 2 ppm, 6 horas/dia, 5 dias/semana, por um mês. Após este período, foi observado que a exposição à acroleína aumentou a clivagem de pró MMP9, bem como sua atividade, determinando transcrições adicionais e liberação desta metaloproteinase (90).

Interessantemente, a concentração inalada de 2 ppm de acroleína por 6 horas equivale à acroleína derivada da queima de 10 cigarros, o mesmo utilizado no presente estudo. A acroleína presente na fumaça de cigarro pode, então, estar correlacionada aos níveis aumentados de MMP9 encontrados neste trabalho (Figura 21).

5.4 Limitações do estudo e considerações gerais

O uso de modelos animais pode trazer uma série de vantagens para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da asma, associados às mais adversas condições. Porém, ainda que a maioria das

respostas biológicas seja mantida entre as espécies, há características próprias de cada animal que não podem ser aplicadas ao homem.

Da transposição dos modelos experimentais que se utilizam de camundongos para a doença humana, uma gama de fatores há ser considerada, devido às grandes diferenças de cunho anatômico e fisiopatológico.

A respiração dos murinos é obrigatoriamente nasal, e a maioria das suas células epiteliais é olfatória e com poucos cílios, redundando em uma menor eficiência na capacidade de filtrar partículas inaladas. Além disso, as glândulas submucosas dos camundongos são esparsas, localizadas principalmente na traquéia, e seu sistema brônquico apresenta um menor número de ramificações que o humano (62).

No âmbito fisiopatológico, uma das diferenças mais marcantes nos murinos, especialmente os da linhagem Balb/C – utilizados neste estudo - é a reversão da inflamação pulmonar quando o processo de sensibilização alérgica crônica é interrompido, comprovada pela deposição de colágeno e espessamento da parede da via aérea pouco intensos, como afirma Shinagawa (91).

O processo do remodelamento pulmonar inclui alterações na produção de muco brônquico, advindas tanto da exposição à fumaça de cigarro como do processo de inflamação pulmonar alérgica (22,49).

Devido à administração de metacolina inalatória, seria plausível imaginar que o aumento da produção de muco brônquico poderia ter dificultado uma ação mais efetiva por parte do agonista no grupo OF, durante a realização da curva dose-resposta.

A fim de sanar esta dúvida, foram realizadas medidas morfométricas de PAS/AB e de muco total nas vias aéreas (em um aumento de 400x, com o mesmo equipamento descrito para análise das demais variáveis), mas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi observada (dados não apresentados nesta tese).

Uma outra observação, que reforça o argumento para o aumento de Htis especificamente observado no grupo OVA, advém de uma forte correlação estatística ($r=0,88$) encontrada entre este parâmetro mecânico na dose de metacolina de 25 mg/mL (resposta máxima obtida) e o número de eosinófilos contado no espaço peribroncovascular dos mesmos animais, (em um aumento de 1000x, com o mesmo equipamento descrito para análise das demais variáveis) ratificando os achados do lavado broncoalveolar (dados não apresentados nesta tese).

Os elementos do cigarro, bem como os tipos de exposição à sua fumaça, podem desempenhar funções importantes relativas à atividade imune. O cigarro é composto por mais de 4.000 substâncias químicas

(50,78), e uma das mais notórias é a nicotina, com reconhecido efeito inibitório sobre o sistema imune (50,75-77).

Vários modelos experimentais têm mostrado que a exposição crônica à fumaça do tipo “mainstream” – inalação direta da queima do cigarro, sem diluição gasosa - provoca uma resposta inibitória no sistema imune, devido aos altos níveis de nicotina (50,56,57).

Já a dose de nicotina advinda de uma exposição do tipo ETS – similar à do “fumante passivo” – é significativamente menor quando comparada com o nível de nicotina dos fumantes, como demonstrado por Seymour e colaboradores, em um modelo experimental (50). Neste sentido, a exposição do tipo ETS parece ser capaz de exacerbar a resposta pulmonar alérgica, enquanto a “mainstream” (reproduzida neste estudo) atuaria no sentido oposto (55).

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que, neste modelo experimental, curtos períodos de exposição à fumaça de cigarro alteram, de maneira diferenciada, as características da inflamação pulmonar alérgica crônica. Existe uma inibição da inflamação alérgica e da hiperresponsividade pulmonares e uma potencialização do remodelamento pulmonar.

A diminuição da hiperresponsividade pulmonar pode estar relacionada ao efeito inibidor da exposição à fumaça de cigarro sobre a inflamação eosinofílica.

O aumento do remodelamento pulmonar – no conteúdo de fibras colágenas – esteve altamente relacionado ao número elevado de células que expressam TGF- β no epitélio brônquico.

7 REFERÊNCIAS

1. NIH. Global Initiative for Asthma. 2008 [acessado em 4 de Dezembro de 2009]. Disponível em: [HTTP://www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org)
2. 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.
3. 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.
4. Sly RM. Continuing decrease in asthma mortality in the United States. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;92(3):313-8.
5. 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.
6. Shafazand S, Colice G. The epidemic has ended or has it? *Chest.* 2004; 125(6):1969-70.
7. KASAHARA DI. *β_2 -agonista como imunomodulador da resposta inflamatória pulmonar crônica induzida em camundongos sensibilizados com ovoalbumina.* São Paulo, 2004. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da USP.
8. McFadden, E.R Jr. The lung, Second Edition, Lippincott-Raven Publishers, 1997.

-
9. Pereira CAC, Naspitz C, et al., II Consenso brasileiro no manejo da asma (1998). *J Pneumol.* 1998;24(4).
 10. Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respir Res.* 2001;2:150-156.
 11. Bisset LR, Schmid-Grendelmeier P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr Opin Pulm Med.* 2005;11:35-42.
 12. Kay AB. Asthma and Inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 87(5):893-910.
 13. Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC. Asthma: basic mechanism and clinical management. 3th Ed. 1998; Academic Press Limited, San Diego, EUA.
 14. Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. Airway Epitelial cells release MIP-3 alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:648-654.
 15. Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med.* 1998;188:2019-2031.
 16. Broide DH, Lawrence T, Doherty T, Cho JY, Miller M, McElwain K, McElwain S, Karin M. Allergen-induced peribronchial fibrosis and mucus production mediated by IkappaB kinase beta-dependent genes in airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:17723-17728.

-
17. Bruijnzeel PLB. Eosinophil tissue mobilization in allergic disorders. *Ann NY Acad Sci.* 1994;725:259-267.
 18. Mire-Sluis A, Thorpe R. Cytokines. 2nd Ed. 1999; Academic Press Limited, San Diego, EUA.
 19. Lampinem M, Carlson M, Venge HP. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disorders. *Ann NY Acad Sci.* 1994;725:259-267.
 20. Rothemberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:5.1-5.28
 21. 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.
 22. Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergology International* 2007;56:331-340.
 23. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo D. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:133-144.
 24. 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.
 25. Carroll N, Elliot J, Morton A et al. The structure of large and small airways in nonfatal an fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:405-410.

-
26. Lanças T, Kasahara DI, Prado CM, Tiberio IF, Martins MA, Dolhnikoff M. Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. *J Appl Physiol* 2006; 100(5):1610-6.
 27. de Magalhães Simoes SM, Santos MA, Oliveira MS, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, Castro I, Castro FF, Martins MA, Saldiva PH, Mauad T and Dolhnikoff M. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(5): 602-611.
 28. Brackel HJL, Pedersen OF, Mulder PGH, Overbeek SE, Kerrebijn KF, Bogaard JM. Central airways behave more stiffly during forced expiration in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:896-904.
 29. James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics in airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139:242–246.
 30. Vignola AM, Mirabella F, Constanzo G, Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, Bonsignori G. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003;123:417S-22S.
 31. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11:1-6.
 32. Ricciardolo FL, Timmers MC, Geppetti PA, van Schadewijk JJ, Brahim, JKS, de Gouw HW, Hiemstra PS, van Krieken JH, Sterk PJ. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:198–204.
 33. Bove PF, Wesleu UV, Greul AK, Hristova M, Dostmann WR, van der Vilet A. Nitric oxide promotes airway epithelial wound repair through enhanced activation of MMP-9. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Sep 15; doi 10.1165/rcmb.2006-0253SM.

-
34. van Wetering S, Zuyderduyn S, Ninaber DK, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Hiemstra PS. Epithelial differentiation is a determinant in the production of eotaxin-2 and -3 by bronchial epithelial cells in response to IL-4 and IL-13. *Mol Immunol*. 2007;44:803-811.
 35. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:193-204.
 36. Chan V, Burgess JK, Ratoff JC, O'connor BJ, Greenough A, Lee TH, Hirst SJ. Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(4):379-85.
 37. Munakata M. Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int*. 2006;55:235-243.
 38. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002;346(22):1699-705.
 39. Brightling CE, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID, Bradding P. Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(12):1711-6.
 40. Wang L, McParland BE, Pare PD. The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma. *Chest*. 2003;123(3Suppl):356S-62S.
 41. Blease K, Lukacs NW, Hogaboan CM, Kunkel SL. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res*. 2000;1:54-61.

-
42. Boushey HA, Holzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis.* 1980;121:389-413.
 43. Sterk PJ. Bronchial hyperresponsiveness today. *Respir Med.* 1993;87:27-29.
 44. Bento AM, Hershenov MB. Airway remodeling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. *Allergy Asthma Proc.* 1998;19:353-358.
 45. INCA. Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas de mortes por Câncer, 2003.
 46. I Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. *J Pneumol* 26 (Supl 1). Abril de 2000.
 47. Moerloose KB, Pauwels RA, Joos GF. Short-term cigarette smoke exposure enhances allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:168-172.
 48. Moerloose KB, Robays LJ, Maes T, Brusselle GG, Turnoy KG, Joos GF. Cigarette smoke exposure facilitates allergic sensitization in mice. *Respir Res.* 2006;7:49.
 49. Min MG, Song DJ, Miller M, Cho JY, McElwain S, Ferguson P, Broide DH. Coexposure to environmental tobacco smoke increases levels of allergen-induced airway remodeling in mice. *J Immunol.* 2007;178:5321–5328.
 50. Seymour BW, Pinkerton KE, Friebertshauser KE, Coffman RL, Gershwin LJ. Second-hand smoke is an adjuvant for T helper-2 responses in a murine model of allergy. *J Immunol.* 1997;159(12):6169-75.

-
51. Althius MD, Sexton M, Prybylski D. Cigarette smoking and asthma symptom severity among adults asthmatics. *J Asthma*. 1999;36:257-264.
 52. James AL, Palmer LJ, Kicic E, Maxwell PS, Lagan SE, Ryan GF, Musk AW. Decline in lung function in the busselton health study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;171:109–114.
 53. Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, LeMoual N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study: epidemiological study on the genetics and environment of asthma. *Eur Respir J*. 2000;15:470–477.
 54. Trimble NJ, Botelho FM, Bauer CMT, Fattouh R, Stämpfli MR. Adjuvant and anti-inflammatory properties of cigarette smoke in murine allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40:38-46.
 55. Melgert BN, Postma DS, Geerlings M, Luinge MA, Klok PA, van der Strate BWA, Kerstjens HAM, Timens W and Hylkema MN. Short-term smoke exposure attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30:880-885.
 56. Nouri-Shirazi M, Guinet E. Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions. *Immunology* 2003;109:365–373.
 57. Nouri-Shirazi M, Guinet E. A possible mechanism linking cigarette smoke to higher incidence of respiratory infection and asthma. *Immunol Lett* 2006;103:167–176.
 58. Tibério IF, Turco GM, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva SO, do Patrocínio M, Warth TN, Lapa e Silva JR, Saldiva PH, Martins MA.

- Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(5):1739-47.
59. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvellier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994;24:73-80.
60. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jul;37(7):973-88.
61. Takeda K, Gelfand EW. Mouse models of allergic diseases. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(6):660-5.
62. Shapiro SD. Animal models of COPD. *Chest*. 2000;117:223s-227s.
63. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997;277:2002-2004.
64. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol*. 1992; 72(1):168-78.
65. Xisto DG, Farias LL, Ferreira HC, Picanço MR, Amitrano D, Lapa e Silva JR, Negri EM, Mauad T, Carnielli D, Silva LFF, Capelozzi VL, Faffe DS, Zin WA, Rocco PRM. Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:829-837.
66. Apostol GG, Jacobs DR Jr, Tsai AW, Crow RS, Williams OD, Townsend MC, Beckett WS: Early life factors contribute to the decrease in lung function between ages 18 and 40: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 2:166-172.

-
67. Bartal M. Health effects of tobacco use and exposure. *Monaldi Arch Chest Dis* 2001;56:545-554.
 68. Jaakkola MS, Ernst P, Jaakkola JJ, et al. Effect of cigarette smoking on evolution of ventilatory lung function in young adults: an eight year longitudinal study. *Thorax* 1991;46:907-13.
 69. Peták F, Hantos Z, Adamicza A, Asztalos T, Sly PD. Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery. *J Appl Physiol*. 1997;82:1479-1487.
 70. Dahlen B, Dahlen SE. Leukotrienes as mediators of airway obstruction and inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995;25:50-54.
 71. O'Byrne, P M. Leukotrienes in the pathogenesis of asthma. *Chest*. 1997;111:27S-34S.
 72. Shaw RJ, Cromwell O, Kay AB. Preferential generation of leukotriene C4 by human eosinophils. *Clin Exp Immunol*. 1984;56:716-722.
 73. Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol*. 1998;83:148-156.
 74. Tsoumakidou M, Elston W, Zhu J, Wang Z, Gamble E, Siafakas NM, Barnes NC, Jeffery PK. Cigarette smoking alters bronchial mucosal immunity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):919-925.
 75. Nouri-Shirazi M, Tinajero R, Guinet E. Nicotine alters the biological activities of developing mouse bone marrow - derived dendritic cells (DCs). *Immunol Lett*. 2007;109:155-164.
 76. Troisi RJ, Speizer FE, Rosner B, Trichopoulos D, Willett WC. Cigarette smoking and incidence of chronic bronchitis and asthma in women. *Chest*. 1995;108:1557-1561.

-
77. Vassallo R, Tamada K, Lau JS, Kroening PR, Chen L. Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J Immunol.* 2005;175:2684–2691.
78. Kasahara DI, Poynter ME, Othman Z, Hemenway D, van der Vliet A. Acrolein inhalation suppress lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production but does not affect acute airways neutrophilia. *J Immunol.* 2008;181(1):736–45
79. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174(5):1209–20.
80. Blease KS, Kunkel L, Hogaboam CM. Acute inhibition of nitric oxide exacerbates airway hyperresponsiveness, eosinophilia and C–C chemokine generation in a murine model of fungal asthma. *Inflamm Res.* 2000;49:297–304
81. Chapman JT, Otterbein LE, Elias JA, Choi AM. Carbon monoxide attenuates aeroallergen-induced inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281:209–216.
82. Chang WC, Lee YC, Liu LJ, Hsu D, Wang HC, Chen CC, Wang CJ. Increased expression of iNOS and c-fos via regulation of protein tyrosine phosphorylation and MEK1/ERK2 proteins in terminal bronchiole lesions in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *Arch Toxicol* 2001;75:28–35.
83. Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:627–635.

-
84. Bai TR, Cooper J, Koelmeyer T, Pare PD, Weir T. The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:663-669.
 85. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147:405– 410.
 86. Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR, Hogg JC. Small airways dimensions in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1220–1225.
 87. Hirst SJ, Walker TR, Chilvers ER. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma. *Eur Respir J.* 2000;16:159-177.
 88. Pare PD, Roberts CR, Bai TR, Wiggs BJ. The functional consequences of airway remodelling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1997;52:589-596.
 89. Churg A, Tai H, Coulthard T, Wang R, Wright JL. Cigarette smoke drives small airway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:1327–1334.
 90. Deshmukh HS, Shaver C, Case LM, Dietsch M, Wesselkamper SC, Hardie WD, Korfhagen TR, Corradi M, Nadel JA, Borchers MT, Leikauf GD. Acrolein-activated matrix metalloproteinase 9 contributes to persistent mucin production. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38:446-454.
 91. Shinagawa K, Kojima M. Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(8):959-67.