

# Novas alternativas para protocolos com modelos murinos de asma

*New alternatives for protocols with murine models of asthma*

Camila Parreira<sup>1</sup>, Andrea Mendonça Rodrigues<sup>2</sup>, Lucien Peroni Gualdi<sup>3</sup>, Raquel Giacomelli Cao<sup>4</sup>, Rodrigo Godinho de Souza<sup>5</sup>, Ana Cláudia Pereira<sup>6</sup>, Nailê Karine Nuñez<sup>7</sup>, Alisson Schleich<sup>8</sup>, Mauro Henrique Vargas<sup>9</sup>, Paulo Márcio Pitrez<sup>10</sup>

<sup>1</sup> Médica pneumologista pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança (PPG-PSC) da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (FAMED-PUCRS).

<sup>2</sup> Médica pneumologista pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS. Mestre e doutoranda pelo PPG-PSC da FAMED-PUCRS.

<sup>3</sup> Fisioterapeuta. Mestre e doutoranda pelo PPG-PSC da FAMED-PUCRS.

<sup>4</sup> Médica. Doutoranda do PPG-PSC da FAMED-PUCRS.

<sup>5</sup> Biólogo. Técnico do Laboratório de Respirologia Pediátrica do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB-PUCRS).

<sup>6</sup> Acadêmica de Biologia na Unisinos. Aluna de iniciação científica da FAMED-PUCRS.

<sup>7</sup> Bióloga. Mestranda pelo PPG-PSC da FAMED-PUCRS.

<sup>8</sup> Acadêmico de Biologia. Aluno de iniciação científica da PUCRS.

<sup>9</sup> Fisioterapeuta. Mestrando pelo PPG-PSC da FAMED-PUCRS.

<sup>10</sup> Doutor em Medicina/Pneumologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor do PPG-PSC da FAMED-PUCRS.

## RESUMO

**Objetivos:** Testar alternativas de protocolos com modelos animais de asma aguda e crônica que apresentem características mais próximas da doença em humanos, utilizando ovalbumina livre de adjuvante.

**Métodos:** Foram utilizadas fêmeas adultas de camundongos BALB/c, divididas em grupos de acordo com as sensibilizações com ovalbumina. O modelo agudo utilizou duas doses de ovalbumina subcutânea, sem adjuvante, com intervalo de sete dias, com posterior desafio intranasal durante três dias, comparado ao protocolo padrão que utiliza três doses de ovalbumina intraperitoneal, no período de sensibilização. O modelo crônico também utilizou ovalbumina subcutânea livre de adjuvante para sensibilização, com intervalo de 14 dias e posterior desafio intranasal, três vezes por semana, durante oito semanas. Contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar e análise histológica dos pulmões foram realizadas 24 horas após o último desafio com ovalbumina.

**Resultados:** Nos dois modelos estudados, agudo e crônico, observou-se uma resposta eosinofílica pulmonar semelhante entre os grupos. A contagem de células e a análise histológica do tecido pulmonar não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados.

**Conclusões:** O uso de sensibilização subcutânea em modelo murino com ovalbumina, sem adjuvante (alum), resulta em significativa resposta inflamatória pulmonar alérgica, com predomínio de eosinófilos, podendo ser uma opção futura para experimentos mais próximos ao modelo humano, tanto na fase aguda, como na fase crônica da doença.

**DESCRIPTORES:** ASMA; ALERGIA; CAMUNDONGOS; OVALBUMINA; MODELOS ANIMAIS.

## ABSTRACT

**Aims:** To test alternative protocols using animal models of acute and chronic asthma, with features closer to human disease, using ovalbumin without adjuvant.

**Methods:** Adult female BALB/c mice were used and divided into groups according to sensitization with ovalbumin. The acute model used two doses of ovalbumin subcutaneously without adjuvant, on days 0 and 7, and after intranasal challenge for consecutive three days, compared with a standard protocol using three doses of ovalbumin for sensitization. The chronic model also used ovalbumin subcutaneously for sensitization, adjuvant-free, on days 0 and 14, and after intranasal challenge, for eight consecutive weeks. Total and differential cell counts from bronchoalveolar lavage and histopathology of the lungs were performed 24 hours after the last ovalbumin challenge.

**Results:** In both models of protocols studied, acute and chronic, we have observed similar allergic pulmonary response between the groups. Cell counts and histological analysis of lung tissue showed no significant difference between groups.

**Conclusions:** Use of sensitization in murine model with ovalbumin subcutaneously, with no adjuvant (alum), resulted in an expected allergic pulmonary response, with predominant eosinophils. These protocols may be a future option to animal models of asthma closer to the human disease, both in the acute and chronic patterns.

**KEY WORDS:** ASTHMA; ALLERGY; MICE; OVALBUMIN; ANIMAL, MODELS.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

PAULO MÁRCIO C. PITREZ  
Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS  
Av. Ipiranga 6690  
CEP 90610-000, Porto Alegre, RS  
Telefone: (51) 3320-3353  
E-mail: pmpitrez@pucrs.br

Recebido: março de 2012. Aceito: junho de 2012.

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, caracterizada por hiper-responsividade brônquica e limitação ao fluxo aéreo, com elevada prevalência e morbidade, resultando em importante impacto econômico no mundo todo.<sup>1-3</sup> A presença e atividade eosinofílica e de linfócitos Th2, associadas à produção de imunoglobulina E (IgE) alérgica são as principais características da doença.<sup>4-6</sup>

Os modelos animais têm sido utilizados há décadas para melhor entendimento da fisiopatogenia e teste de novos tratamentos para asma. O modelo murino é o mais amplamente utilizado em estudos de asma devido ao baixo custo, fácil manipulação e genética detalhadamente conhecida. Camundongos são animais facilmente sensibilizados a diversos antígenos, incluindo a ovalbumina (OVA), uma proteína encontrada no ovo capaz de produzir elevadas quantidades de IgE e causar uma importante resposta pulmonar alérgica.<sup>7</sup> No entanto, os protocolos experimentais atualmente mais utilizados para asma, utilizando sensibilização de camundongos com OVA, têm recebido críticas, tanto por apresentar alguns aspectos “artificiais” em relação à asma em humanos, quanto por apresentar resultados de novas terapias eficazes em testes pré-clínicos que não demonstraram eficácia quando testadas em humanos.<sup>8</sup> Nesses modelos de asma, amplamente utilizados em pesquisa para estudos mecanísticos e testes pré-clínicos, atualmente, as principais limitações levantadas tem sido: 1) a sensibilização através da via intraperitoneal (i.p.) e com uso de adjuvante – alum (sensibilização em asma é predominantemente por aeroalergenos); 2) o uso de protocolos exclusivamente agudos (uma característica importante da asma é o curso crônico); 3) e a utilização de OVA como alérgico (antígeno este não relacionado causalmente à asma em humanos). Assim, classicamente e mais frequentemente, camundongos da linhagem BALB/c são expostos à OVA i.p. para sensibilização, em um intervalo de 14 dias, com alum, seguido de desafio intranasal (i.n.) com OVA por 3 dias consecutivos (controle positivo)<sup>9</sup>. Este tem sido o protocolo mais utilizado na literatura, mas o uso do adjuvante tem sido uma das críticas mais fortes por ser um método muito artificial para potencializar a resposta pulmonar alérgica. Mais recentemente, modelos de asma crônica têm sido explorados e testados, com exposições intranasais por aproximadamente oito semanas, a OVA e a extrato de ácaro.<sup>9-11</sup> Conrad et al. demonstraram que a sensibilização por via subcutânea (s.c.) com OVA, sem adjuvante, em um modelo agudo de asma, resulta

em uma resposta pulmonar eosinofílica semelhante ao modelo com adjuvante.<sup>12</sup>

A busca de modelos animais com protocolos mais semelhantes à doença em humanos, e com características mais abrangentes, potencialmente permitirá entender melhor os mecanismos da doença e tornar os testes pré-clínicos mais eficazes. Assim, o objetivo do presente estudo é buscar alternativas de protocolos com modelos animais de asma aguda e crônica, reunindo características mais próximas do modelo humano. Para isto, realizamos experimentos para estudar modelos murinos tanto agudos quanto crônicos, testando a sensibilização s.c. com OVA, número de sensibilizações, ausência de adjuvante, comparando com outros protocolos utilizados classicamente em estudos prévios.

## MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com idade de oito semanas, provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração e água, submetidos a fotoperíodos de 12 horas claro/12 horas escuro e mantidos em condições ideais de temperatura. Para o modelo agudo foram utilizados 34 camundongos, divididos em seis grupos. No modelo crônico, foram utilizados 18 animais, divididos em três grupos.

O estudo foi realizado a partir de normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), utilizando o menor número possível de animais e manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia. O estudo teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

### Sensibilização e desafio intranasal com OVA

#### *Protocolo agudo*

O primeiro grupo em estudo recebeu a sensibilização com OVA (grau V, Sigma, USA) nos dias 0, 7 e 14, por via s.c., livre de adjuvante. Outros dois grupos foram sensibilizados por via s.c., recebendo apenas solução fisiológica 0,9% no dia 0 e OVA nos dias 7 e 14, com um grupo livre de adjuvante e o outro grupo com alum. Para o controle negativo, foi utilizada apenas solução fisiológica 0,9% como sensibilização nos dias 0, 7 e 14. Nos dois últimos grupos, os animais foram sensibilizados com OVA, via i.p. (dias 0 e 14), na dose

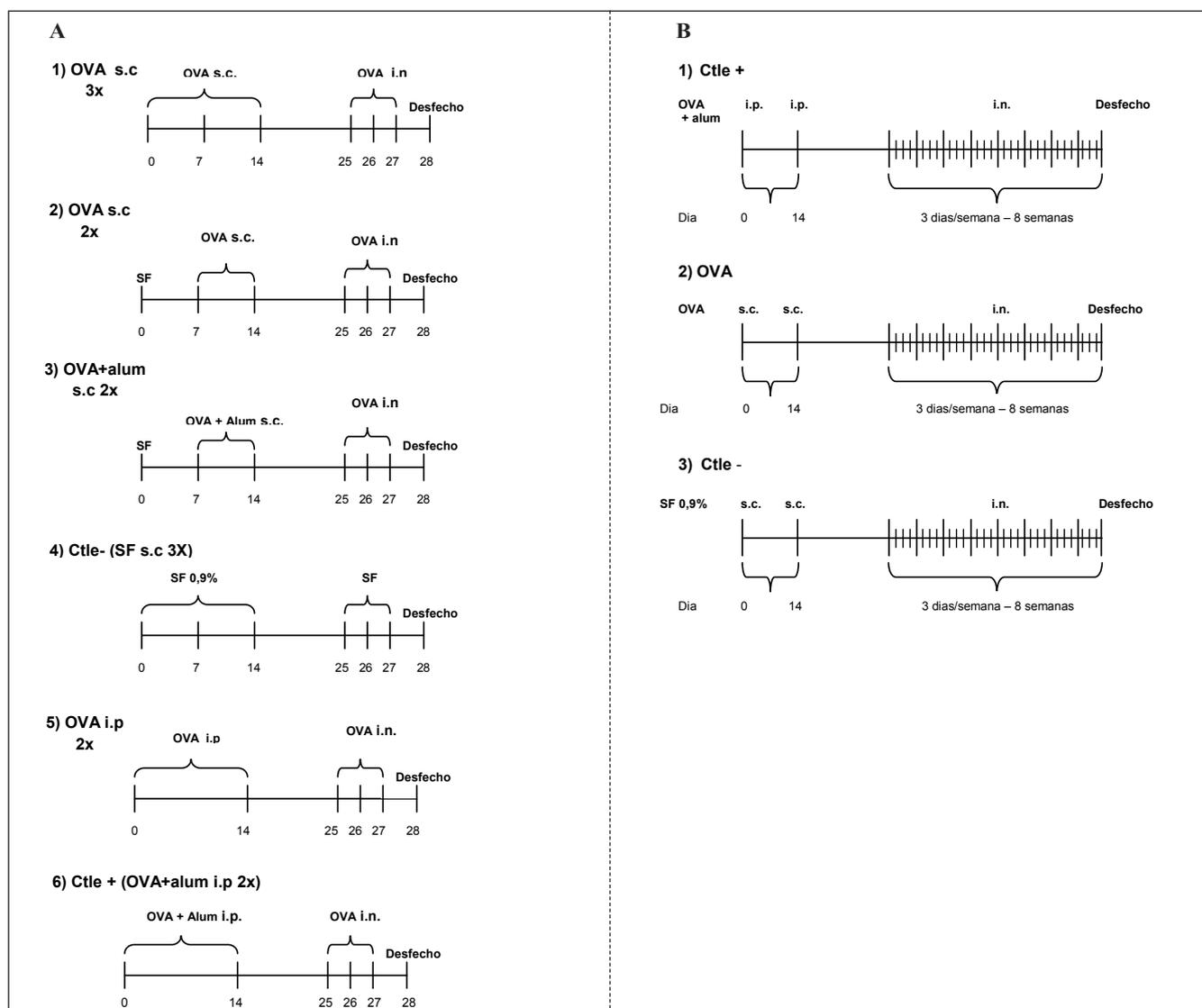
de 20 µg, diluída em 200 µl de DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*), sendo um grupo livre de adjuvante e outro utilizando 1 mg de alum (controle positivo), sendo este, o protocolo tradicionalmente utilizado. (Figura 1-A)

O desafio i.n. foi sempre realizado sob anestesia geral com isoflurano em câmara anestésica, para aspiração pulmonar da solução de OVA. O desafio i.n. foi realizado após 11 dias da última sensibilização, durante três dias consecutivos, por via i.n., com OVA (100 µg, diluída em 50 µl de DPBS). O grupo controle negativo recebeu apenas solução fisiológica 0,9% por via i.n. (Figura 1)

### Protocolo crônico

Nos experimentos de exposição crônica ao alérgeno, os grupos foram submetidos a um protocolo

com 11 semanas de duração. Os animais foram sensibilizados da mesma forma que o modelo agudo com OVA por via i.p. e s.c., por duas vezes, com intervalo de 14 dias. Após uma semana da última sensibilização, foi iniciado o desafio i.n. com OVA, três vezes por semana, durante oito semanas. Durante o período de sensibilização, o primeiro grupo recebeu OVA e alum por via i.p., com intervalo de 14 dias (controle positivo). O segundo grupo recebeu apenas OVA s.c., livre de adjuvante, no mesmo período, e o terceiro grupo recebeu solução fisiológica 0,9%, por via s.c., com intervalo de 14 dias (controle negativo). Os dois primeiros grupos realizaram o desafio i.n. com OVA na dose de 40 µg de OVA diluída em 50 µl de DPBS, três vezes por semana, por oito semanas, e o terceiro grupo recebeu apenas SF 0,9% nos mesmos dias (Figura 1-B).



**Figura 1. A:** Protocolos utilizados para indução de resposta inflamatória aguda em pulmões de camundongos BALB/c fêmeas. **B:** Protocolos utilizados para indução de resposta pulmonar alérgica crônica em camundongos BALB/c fêmeas. OVA: ovalbumina; s.c.: subcutânea; i.p.: intraperitoneal; i.n.: intranasal; Ctle: Controle; SF: solução fisiológica 0,9%.

## Lavado broncoalveolar (LBA)

Foi realizado LBA em todos os animais no final do protocolo experimental. O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100 mg/ml) e cetamina (100 mg/ml), proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml). Uma solução de DPBS (1 ml) foi instilada por via intratraqueal, e aspirada logo após, por três vezes consecutivas. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais dos fármacos utilizados para anestesia (dose: 0,3 ml, i.p.) e descartados de acordo com as normas da instituição.

## Contagem total de células e exame citológico diferencial do LBA

A amostra do LBA foi pesada e centrifugada a 4° C (1.500 rpm, por 10 minutos). O precipitado foi suspenso com 1 mL de DPBS. Foi realizada a contagem total de células (CTC) e o cálculo de viabilidade celular nesta suspensão, em todas as amostras, através do método de exclusão de azul de tripan, em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em citocentrífuga (30 g, por 5 minutos). As células foram analisadas de acordo com sua morfologia, após coloração com May-Grünwald-Giemsa. Os tipos celulares observados ao microscópio óptico foram expressos em percentagem, após a contagem de 200 células.

## Análise histopatológica

Após a realização do LBA, foi realizada a remoção dos pulmões e instilada formalina tamponada a 10% através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar, com cortes de 4 µm, e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e vermelho de picrossirius, para análise morfológica e de depósito de colágeno, respectivamente, em microscópio óptico. Uma avaliação qualitativa da presença de resposta inflamatória brônquica foi realizada, bem como contagem do número de eosinófilos em um campo (três brônquios diferentes), para classificação de gravidade da inflamação eosinofílica.

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 17.0. Inicialmente foi realizada a análise descritiva das variáveis para os dois modelos. O

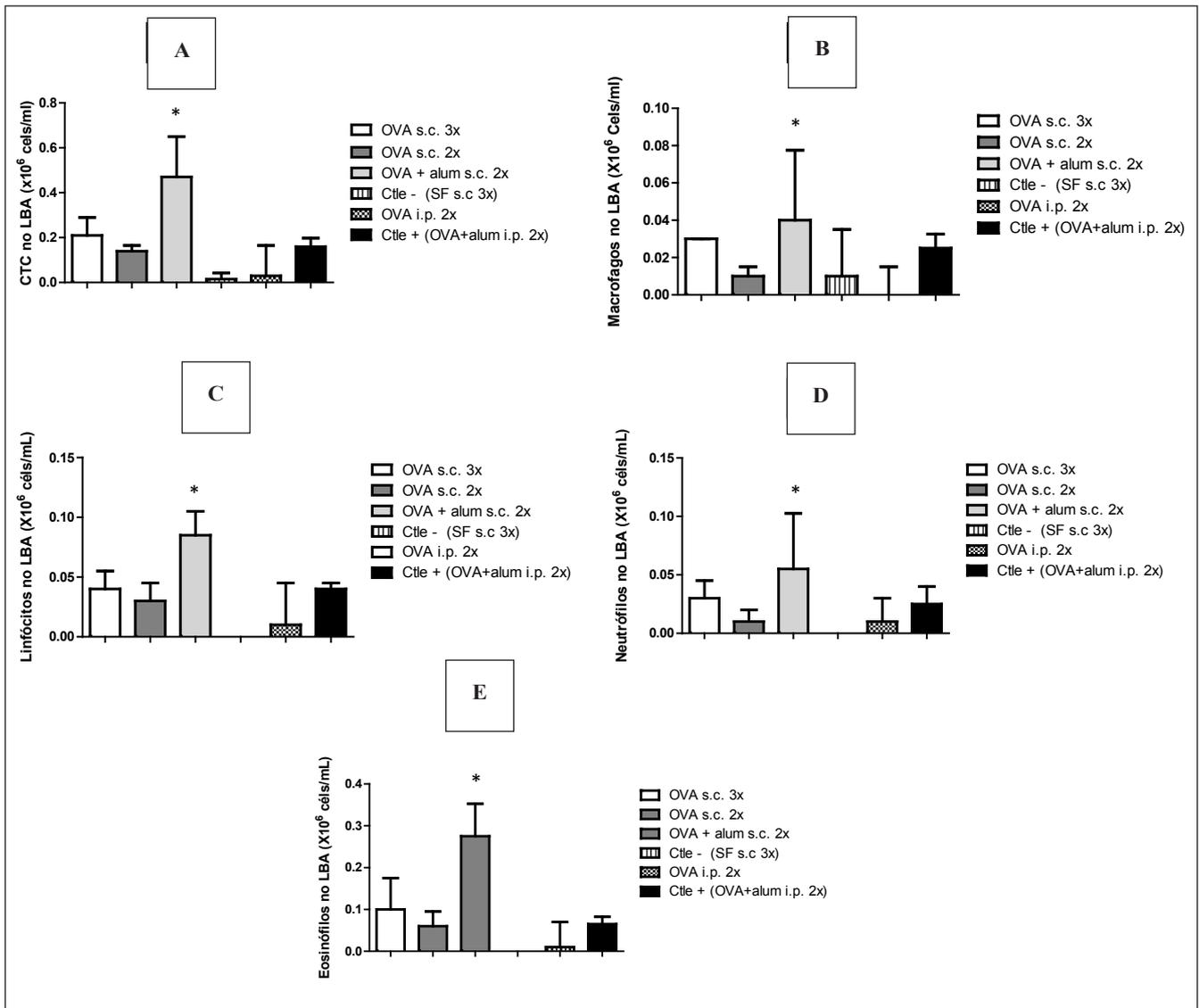
cálculo do tamanho amostral foi de seis animais por grupo no modelo agudo e sete no modelo crônico. Este cálculo foi baseado originalmente em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA, para uma média de  $0,7 \times 10^6$  células/ml, com desvio padrão de  $\pm 0,34$ , um valor de  $p=0,05$ , e poder de 80%, com diferença entre as médias dos grupos estimada em 50%.

Tanto no modelo agudo como no crônico, dados apresentaram um padrão de distribuição normal, sendo então utilizado teste paramétrico de ANOVA, com análise *post-hoc* de Tukey, para comparações que atingiram significância estatística. O nível de significância estabelecido foi de 0,05. Como desfecho principal, utilizamos a contagem, atividade e presença de eosinófilos no pulmão dos animais, pois os eosinófilos são considerados um dos principais tipos de células efetoras do sistema imune na inflamação brônquica da asma.

## RESULTADOS

Os experimentos foram realizados em fase aguda e crônica da resposta pulmonar alérgica em camundongos, utilizando o controle positivo para comparar com os grupos de novos protocolos.

No modelo agudo, a média do retorno do LBA de todos os animais foi de  $0,56 \text{ ml} \pm 0,20$  e a viabilidade celular média foi de 91%. A média de eosinófilos do LBA no grupo controle negativo foi de  $2,5\% \pm 2,59$ , e no controle positivo foi de  $40,16\% \pm 9,16$ . Ao analisarmos a contagem total de células, observamos aumento significativo apenas do grupo 3, quando comparados aos demais ( $p < 0,02$ ). Na contagem diferencial das células, novamente obtivemos diferença apenas em relação ao grupo 3. A contagem de macrófagos apresentou diferença desse grupo em relação aos grupos 2 ( $p=0,02$ ) e 5 ( $p=0,01$ ), e a contagem de linfócitos apenas não mostrou diferença do grupo 3 quando comparado ao grupo 1. Em relação à contagem de neutrófilos, observamos diferença significativa do grupo que utilizou OVA s.c. e alum em relação aos grupos 2 ( $p=0,017$ ), 4 ( $p=0,004$ ) e 5 ( $p=0,024$ ). Por fim, a contagem de eosinófilos apresentou diferença significativa novamente desse grupo quando comparado a todos os demais (Figura 2). Os grupos que utilizaram OVA s.c. sem o uso de adjuvante apresentaram uma resposta inflamatória pulmonar semelhante ao controle positivo (OVA i.p. com alum), inclusive o grupo que utilizou o protocolo mais curto de 21 dias (grupo 2), com OVA s.c., livre de adjuvante, particularmente na CTC e no número de eosinófilos.



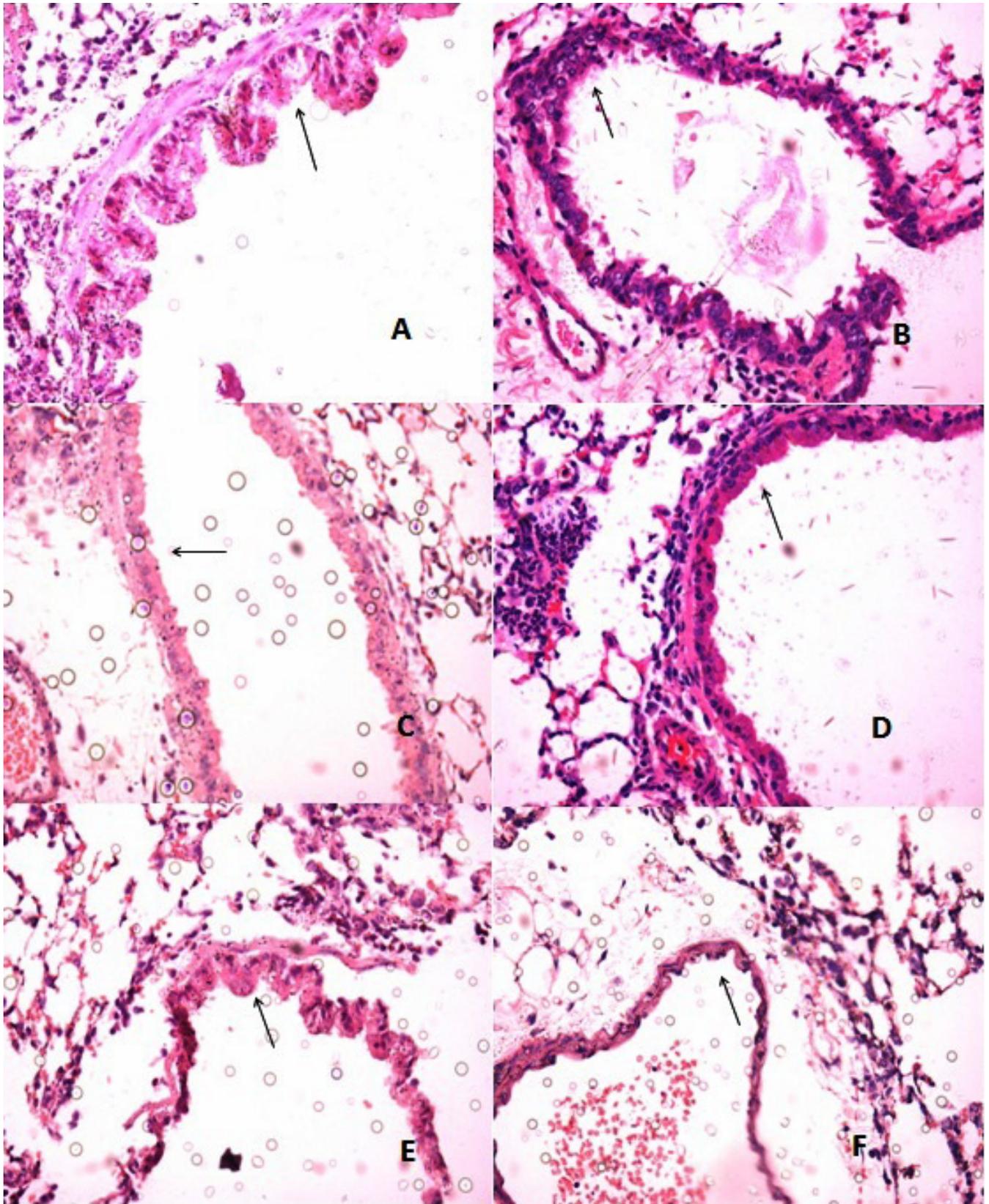
**Figura 2.** Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados no modelo agudo. Foi utilizado o teste ANOVA, com post-hoc de Tukey. \*  $p < 0,05$ . OVA: ovalbumina; Ctle: controle

A análise histológica do modelo agudo demonstrou infiltrado inflamatório moderado a intenso, com predomínio de linfócitos e presença de mais de 100 eosinófilos em região peribrônquica por campo, em todos os grupos estudados. O controle negativo apresentou anatomia preservada, sem alterações inflamatórias, característico de animais saudáveis (Figura 3).

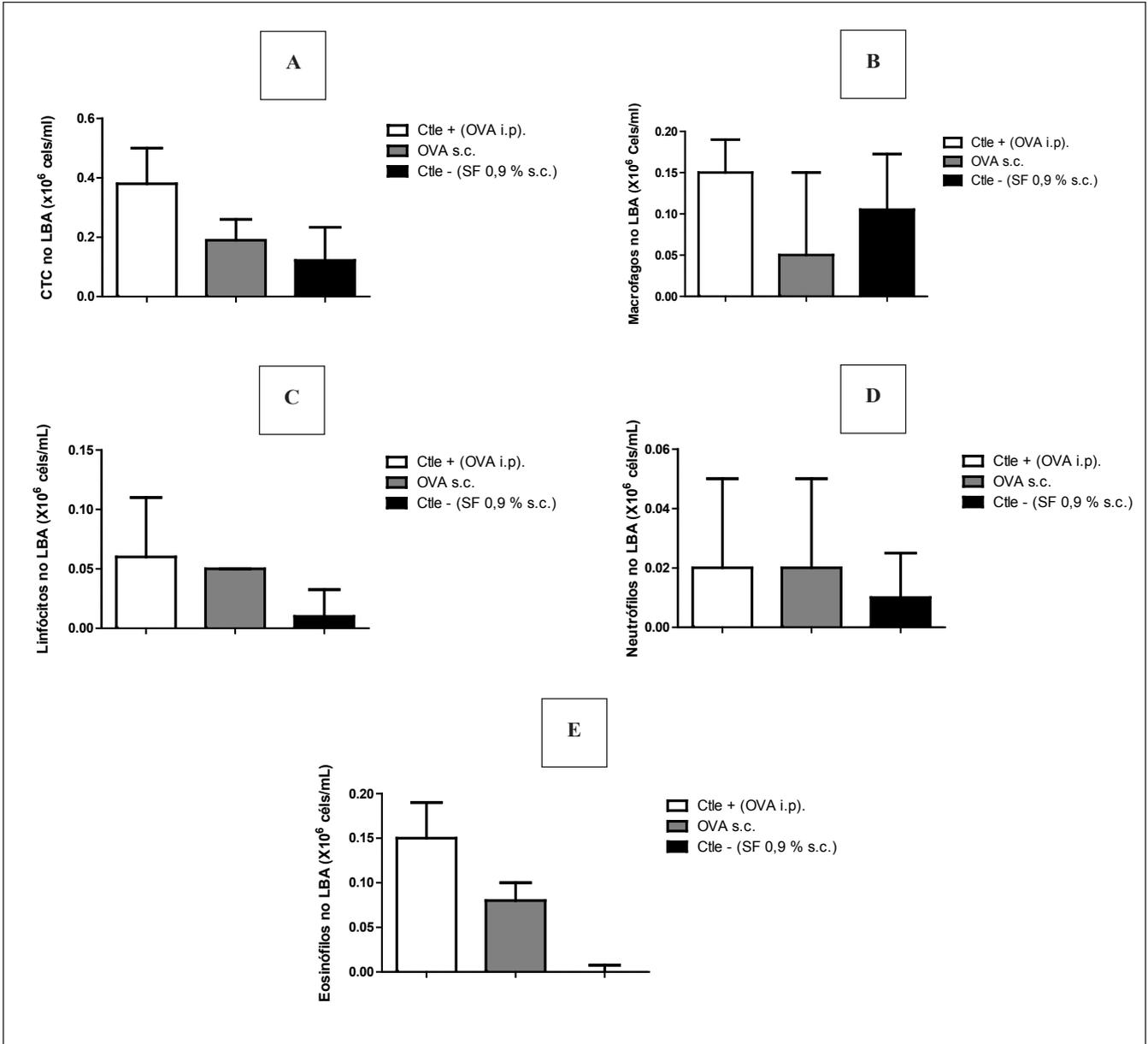
No modelo crônico, a média do retorno do LBA de todos os animais foi de  $0,6 \text{ ml} \pm 0,15$ . A média de eosinófilos no LBA do grupo controle negativo foi de  $1,75\% \pm 1,48$ , e no controle positivo foi de  $37,71\% \pm 6,21$  ( $p < 0,05$ ). Ao analisarmos a contagem total de células, não observamos diferença significativa quando comparamos o controle positivo com o grupo que

foi sensibilizado com OVA s.c. e livre de adjuvante. Da mesma forma, quando analisamos o número de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, observamos uma resposta inflamatória pulmonar entre o grupo de OVA i.p. e de OVA s.c. (Figura 4).

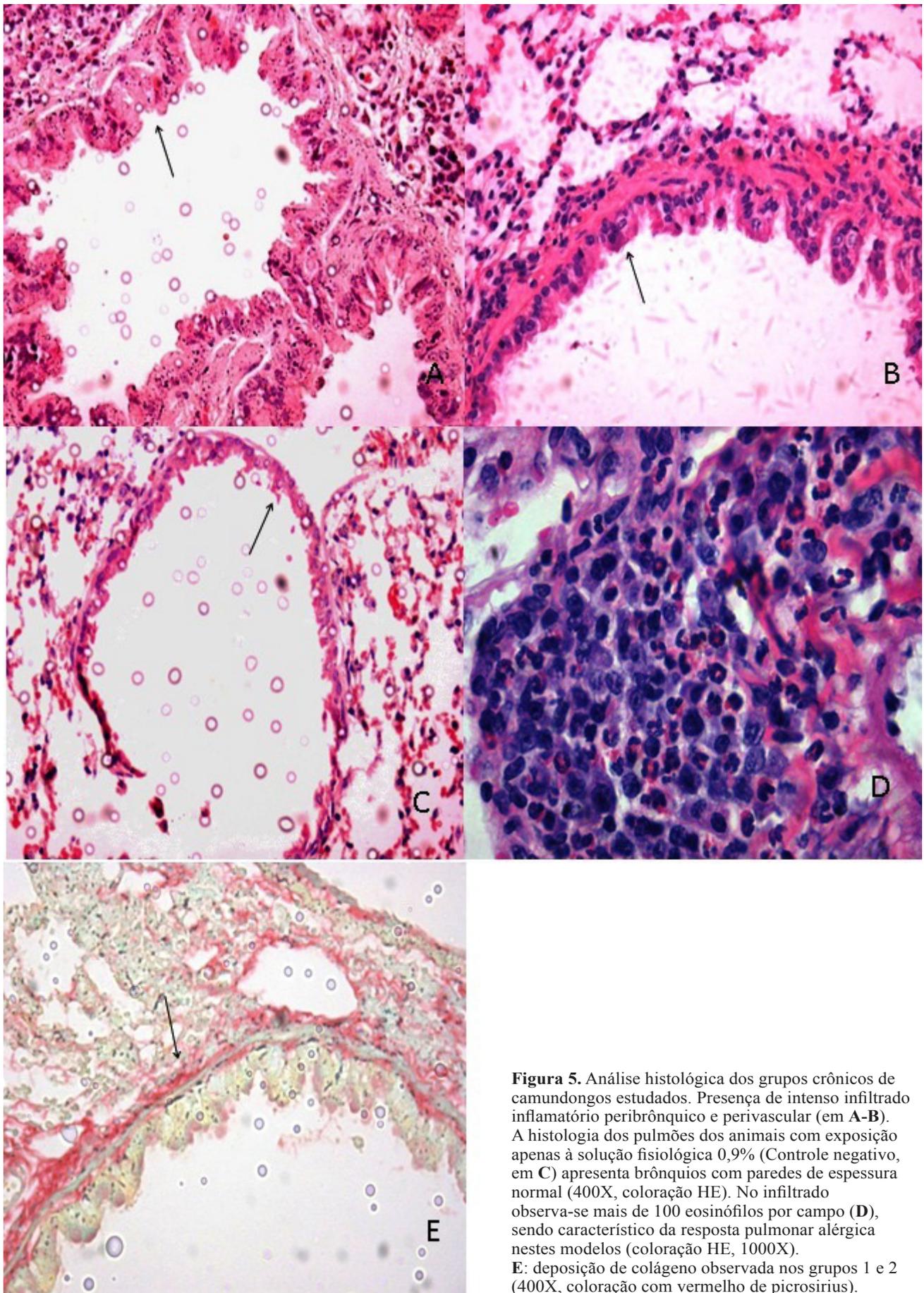
A análise histológica do protocolo crônico demonstrou infiltrado pulmonar moderado a intenso, com predomínio de linfócitos e eosinófilos. Além disso, foi possível observar a presença de fibrose do tecido pulmonar nos dois grupos estudados e deposição de colágeno na parede das vias aéreas. Alguns animais do grupo controle negativo apresentaram leve infiltrado pulmonar, porém com anatomia preservada e contagem celular compatível com animais saudáveis (Figura 5).



**Figura 3.** Análise histológica dos grupos de camundongos estudados. Presença de intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivasculare (em A, B, C, D e E) em todos os grupos sensibilizados. A histologia dos pulmões dos animais com exposição apenas à solução fisiológica 0,9% (Controle negativo, em F) apresenta brônquios com paredes de espessura normal (400X, coloração HE).



**Figura 4.** Comparação da contagem total de células (CTC) e da contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA) entre os grupos estudados no modelo crônico. Foi utilizado o teste ANOVA, com post-hoc de Tukey. \* p<0,05. OVA: ovalbumina; Ctle: controle.



**Figura 5.** Análise histológica dos grupos crônicos de camundongos estudados. Presença de intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular (em **A-B**). A histologia dos pulmões dos animais com exposição apenas à solução fisiológica 0,9% (Controle negativo, em **C**) apresenta brônquios com paredes de espessura normal (400X, coloração HE). No infiltrado observa-se mais de 100 eosinófilos por campo (**D**), sendo característico da resposta pulmonar alérgica nestes modelos (coloração HE, 1000X). **E**: deposição de colágeno observada nos grupos 1 e 2 (400X, coloração com vermelho de picrosirius).

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada particularmente a influência do uso de adjuvante na resposta pulmonar alérgica a OVA, da rota (s.c. vs i.p.) e número de sensibilizações em diferentes períodos, incluindo protocolos de exposição aguda e crônica. Demonstramos que protocolos alternativos para estudo de modelos animais em asma aguda e crônica podem ser realizados de forma menos artificial e mais próxima à doença em humanos. Ao compararmos diferentes grupos de camundongos BALB/c sensibilizados com OVA através da via s.c., observamos a mesma resposta pulmonar alérgica encontrada quando utilizamos a via i.p. Além disso, o uso de adjuvante parece não ser necessário e essencial para desencadear uma resposta eosinofílica no pulmão murino.

Resultados relevantes puderam ser confirmados através desta pesquisa. No modelo agudo, o uso da via s.c. sem a utilização de adjuvante desencadeou uma resposta semelhante ao controle positivo que sensibiliza os animais com OVA via i.p., juntamente com alum. Além disso, observamos que um protocolo mais curto, com duração de 21 dias, pode gerar uma resposta pulmonar alérgica significativa, facilitando a realização de testes pré-clínicos, particularmente em um cenário de pesquisa da indústria farmacêutica, reduzindo os custos e a duração dos experimentos.

O uso de alum como adjuvante tem sido bastante criticado, por ser uma substância que induz artificialmente a produção de citocinas pró-inflamatórias, provocando uma ativação robusta de linfócitos Th2.<sup>9-11</sup> Conrad e colaboradores observaram que não houve diferença significativa em relação à contagem de células no LBA, análise da histologia pulmonar e níveis de interleucinas (IL-5, IL-10 e IL-13), quando utilizaram sensibilização s.c. com OVA, sem adjuvante.<sup>13</sup> Conseguimos reproduzir os resultados daquele estudo, porém com a vantagem de utilizar apenas duas sensibilizações, tornando o protocolo um pouco mais curto, deixando ainda mais claro que é possível realizar protocolos de menor duração e principalmente mais próximos ao modelo humano.

Desenvolvemos também neste estudo um protocolo para o aspecto crônico da asma. Este tem sido um tema muito discutido devido à ausência da resposta pulmonar alérgica nos animais nessa fase da doença. Algumas alterações, como remodelamento brônquico, caracterizado pela presença de fibrose subepitelial, hiperplasia de células caliciformes e hipertrofia da musculatura lisa, são características persistentes encontradas na fase crônica da doença em

humanos.<sup>14-16</sup> Os modelos animais crônicos de asma envolvem exposição ao antígeno por um período de oito semanas ou mais, mas o desafio de longa duração pode induzir uma tolerância imunológica com o uso da OVA, caracterizada pela inibição posterior da inflamação no pulmão dos animais expostos ao antígeno por longos períodos.<sup>17-19</sup> Sabe-se que o modelo murino sensibilizado com OVA responde inicialmente ao desafio inalado. No entanto, com o seguimento do protocolo, o animal parece se tornar “tolerante” ao alérgeno.<sup>16, 20, 21</sup> Desse modo, a resposta inflamatória costuma ser reduzida, tornando os protocolos crônicos com OVA mais difíceis para avaliação da lesão do tecido pulmonar na fase crônica da asma.<sup>22</sup> Ao contrário desses estudos, Temelkovski et al. conseguiram desenvolver um modelo crônico (oito semanas) de asma com OVA utilizando doses mais baixas de OVA inalada, demonstrando o desenvolvimento de algumas características de remodelamento brônquico.<sup>23</sup> A princípio, na mesma linha de Temelkovski et al., o nosso protocolo crônico com asma demonstrou presença de inflamação e de deposição de colágeno nas vias aéreas. A indução de tolerância imunológica pode estar relacionada com a influência do uso de adjuvante, devendo-se ter especial atenção com os resultados encontrados. Em nosso estudo pudemos perceber que o grupo que recebeu sensibilização s.c. com OVA sem uso de adjuvante apresentou uma resposta inflamatória semelhante ao grupo que utilizou OVA i.p. com uso de alum (controle positivo), sendo assim dispensável o uso desta substância. Além disso, suspeita-se também que a inibição da resposta inflamatória pode ser causada pelo tipo de alérgeno utilizado, devendo-se, portanto, substituir o uso de OVA por alérgenos mais próximos ao modelo humano. Jordana et al. realizaram um estudo utilizando ácaro de poeira doméstica e observaram que nove semanas após a exposição ao alérgeno a inflamação das vias aéreas apresentava-se totalmente resolvida, enquanto se mantinham características de remodelamento brônquico e hiper-reatividade das vias aéreas.<sup>24</sup>

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Quanto ao modelo crônico, devemos observar a resposta dos animais algumas semanas após o desafio i.n., a fim de perceber se as características da doença crônica permanecem. Além disso, deve ser estimulada a realização de outros estudos com alérgenos mais próximos à asma causada em humanos, como o ácaro da poeira doméstica ou antígenos de barata, para que os resultados possam ter maior validade em testes pré-clínicos. Já no modelo agudo, podem ser testados protocolos ainda mais curtos que facilitem os estudos pré-clínicos, reduzindo custos, tempo dos experimentos

e, além disso, seguindo preceitos éticos de menor tempo de exposição dos animais e conseqüentemente menor sofrimento.

Concluindo, novos modelos murinos de asma aguda, sem uso de adjuvante, mostraram uma resposta inflamatória pulmonar significativa, com predomínio de eosinófilos, podendo ser uma opção futura para experimentos mais próximos ao modelo humano. Protocolos mais curtos também podem ser desenvolvidos, a fim de facilitar as pesquisas nesta área. Além disso, os modelos crônicos apresentaram sinais característicos de depósito de colágeno na via aérea, semelhante a um dos aspectos do remodelamento brônquico. Entretanto, estes protocolos devem ser futuramente estudados após algumas semanas do término da exposição, para que possamos observar se essas características são mantidas em longo prazo da mesma maneira como observamos em humanos. Por fim, a utilização desses protocolos deve ser validada em testes pré-clínicos utilizando fármacos conhecidos para o tratamento da asma e consolidando assim sua validade na pesquisa experimental desta importante doença.

## REFERÊNCIAS

1. von Mutius E. The burden of childhood asthma. *Arch Dis Child*. 2000;82(suppl 2):ii2.
2. Fischer GB, Camargos PAM, Mocelin HT. The burden of asthma in children: a Latin American perspective. *Paediatr Resp Rev*. 2005;6:8-13.
3. Cooper P, Rodrigues L, Cruz A, et al. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy*. 2009;64:5-17.
4. Pneumologia JB. IV diretrizes brasileiras para o manejo da asma. 2006.
5. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Mod Mechan*. 2008; 1:213.
6. Fulkerson P, Rothenberg M, Hogan S. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1251-3.
7. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jul;37:973-88.
8. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma-chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets*. 2008 Jun;9:495-502.
9. Eisenbarth S. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:1572-5.
10. Shapiro SD. Animal models of asthma: Pro: Allergic avoidance of animal (model[s]) is not an option. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1171-3.
11. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, et al. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. 1999;163:6448-54.
12. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1246-54.
13. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*. 1985;83:209-15.
14. Tang ML, Wilson JW, Stewart AG, et al. Airway remodelling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther*. 2006;112:474-88.
15. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*. 2006;86:245-78.
16. Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:267-72.
17. Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, et al. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol*. 1999;154:1911-21.
18. Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:627-35.
19. Jungsuwadee P, Benkovszky M, Dekan G, et al. Repeated aerosol allergen exposure suppresses inflammation in B-cell-deficient mice with established allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;133:40-8.
20. Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR, et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+regulatory T cells. *J Exp Med*. 2006;203:2649-60.
21. Andrew DK, Schellenberg RR, Hogg JC, et al. Physiological and immunological effects of chronic antigen exposure in immunized guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984;75:208-13.
22. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*. 2008;9:485-94.
23. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*. 1998;53:849-56.
24. Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, Coyle AJ, et al. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol*. 2004;173:6384-92.