

Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada

Murine models for asthma research: An updated critical analysis

Lucien Peroni Gualdi¹, Ana Claudia Pereira², Larissa Masiero², Nailê Karine Nuñez², Raquel Cao³, Paulo Márcio Condessa Pitrez⁴

¹ Fisioterapeuta. Mestre e doutoranda pelo programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

² Aluna de iniciação de pesquisa do Laboratório de Respirologia Pediátrica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

³ Doutoranda do programa de Pós-graduação em Clínica Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

⁴ Professor da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Doutor em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

Objetivos: discutir as vantagens e limitações de pesquisas com modelos murinos em asma e suas aplicações mais imediatas.

Fonte de Dados: foi realizada revisão da literatura no PubMed. Os descritores utilizados foram: *mice, asthma, animal model e murine model*.

Síntese dos Dados: modelos experimentais murinos têm sido muito utilizados para elucidar a fisiopatogenia da asma brônquica e para avaliar novos alvos terapêuticos. Diversas críticas surgiram nos últimos anos em relação aos modelos utilizados. Os modelos animais diferem bastante da asma em humanos, particularmente em relação à utilização de adjuvante, via de administração e dose dos alérgenos, além do tipo de resposta inflamatória pulmonar.

Conclusões: novos modelos experimentais devem reproduzir da forma mais próxima possível as características da asma em humanos. Embora o modelo murino apresente inúmeras vantagens em relação a outros modelos animais, as limitações inerentes a esse tipo de estudo devem ser levadas em consideração no momento da extrapolação dos resultados para a doença em humanos.

DESCRIPTORIOS: ASMA/fisiopatologia; MODELOS ANIMAIS; MURIDAE; CAMUNDONGOS.

ABSTRACT

Aims: To discuss the advantages and limitations of studies using murine models in asthma and the most immediate applications.

Source of Data: A review of the literature using PubMed database was performed. The keywords used were: *mice, asthma, animal model and murine model*.

Summary of Findings: Experimental models have been used to elucidate the pathophysiology of asthma and to evaluate new therapeutic targets. Several limitations related to the models currently used have emerged in recent years. Animal models are very different from the human asthma, particularly regarding to the use of adjuvant, administration route, dose of allergen and the type of pulmonary inflammatory response.

Conclusions: New experimental models must reproduce the characteristics of human asthma as close as possible. Although murine models show several advantages in relation to other animals, the inherent limitations of this type of study must be considered before the extrapolation of results to human pathology.

KEY WORDS: ASTHMA/physiopathology; MODELS, ANIMAL; MURIDAE; MICE.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

LUCIEN PERONI GUALDI
Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS
Av. Ipiranga, 6690, 2º andar
CEP 90610-000, Porto Alegre/RS
Telefone: 3320-3353/2313
E-mail: lugualdi@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas, com elevada prevalência e morbidade em todo o mundo, caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiper-responsividade brônquica. A inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença, orquestrada principalmente por linfócitos *T-helper* (Th) 2, que expressam citocinas que ativam a resposta alérgica, como interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13.¹ Resultante da sensibilização a alérgenos específicos, diversas células, citocinas e mediadores inflamatórios participam da resposta imune e da inflamação tecidual. A presença e atividade de eosinófilos, macrófagos, mastócitos, imunoglobulina (Ig) E específica para alérgenos e linfócitos Th2 nas vias aéreas são características da doença.^{2,3}

Devido a sua importância e complexidade, a asma tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Inúmeras questões relacionadas à fisiopatogenia da doença ainda não foram respondidas, e ainda não estão bem estabelecidos modelos experimentais eficazes para testes pré-clínicos de novas terapias. Os modelos animais têm sido utilizados por mais de 100 anos para elucidar a fisiopatogenia de doenças humanas e para avaliar novos alvos terapêuticos. Em relação à asma, desde o início da década de 1990 foram estabelecidos modelos com camundongos para estudar aspectos específicos da doença, permitindo realizar estudos em animais isogênicos com os sistemas imune e respiratório intactos. Modelos animais representam o único método disponível para estudar alguns processos *in vivo* da doença, já que aspectos éticos não permitem realizar alguns procedimentos invasivos em seres humanos.^{3,7}

Muitas características fisiopatológicas da asma de origem atópica foram descobertas em espécies animais, entre elas camundongos, ratos, ovelhas, gatos, cachorros e cavalos.⁸ Destaca-se a importância dos modelos animais na descoberta do papel da resposta imune Th2 e na disponibilização de modelos pré-clínicos para testes de novas terapias em potencial. No entanto, algumas terapias que mostraram efeito benéfico nesses modelos acabaram demonstrando pouco benefício em pesquisas clínicas em humanos com asma. Assim, a extrapolação dos resultados de estudos em animais para seres humanos depende de alguns fatores limitantes que têm sido discutidos pela comunidade científica nos últimos anos.⁵ O modelo animal ideal deve reproduzir os principais aspectos da asma, incluindo sensibilização ao antígeno mediada por IgE, broncoconstrição aguda, aumento da resistência de vias aéreas, produção de citocinas, linfócitos Th2 e eosinofilia, entre outros.⁴ Infelizmente,

ainda não foi possível desenvolver esse modelo ideal, pois os inúmeros modelos descritos e utilizados ainda apresentam limitações. Entretanto, a utilização de animais nas pesquisas em asma é essencial para melhor entender os mecanismos das doenças e testar novos fármacos antes de aprovar estudos em humanos.

Apesar das inúmeras considerações que devem ser feitas antes da escolha do modelo animal, o número de espécies para estudos em asma é vasto. Embora nenhuma espécie animal reproduza as características completas da asma em humanos, existem algumas nas quais certos aspectos são mais similares, sendo elas as mais utilizadas.^{4,5} Camundongos com resposta pulmonar alérgica aguda têm sido o modelo mais amplamente utilizado com o propósito de elucidar mecanismos de doença e avaliar a eficácia de novos fármacos como teste pré-clínico, já que são mais fáceis de manusear e têm, ainda, a vantagem do baixo custo e de linhagens transgênicas, quando comparados a animais de maior porte.^{1,5}

O presente artigo tem como objetivo, à luz da literatura vigente, discutir as vantagens e limitações de pesquisas em modelos murinos em asma e suas aplicações mais imediatas. O termo “modelo murino de asma”, apesar de não refletir do ponto de vista translacional a doença em humanos, será utilizado nesse artigo devido ao seu amplo uso, sendo um termo relativamente padronizado na comunidade científica.

MODELOS EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS

Existem inúmeras justificativas relacionadas ao uso do modelo murino, bem como de outros modelos, em pesquisa biomédica. A mais importante delas está relacionada às considerações éticas, que limitam a realização de muitos estudos em humanos, em situações que necessitam de procedimentos mais invasivos e quando não existe conhecimento prévio da eficácia e toxicidade *in vivo* de novos fármacos. Outro fator importante a ser considerado é o custo financeiro que envolve um ensaio clínico em seres humanos, já que camundongos são uma espécie de baixo custo e de fácil alojamento e cuidados. Levando em consideração os aspectos técnicos de uma pesquisa em modelos animais, podemos dizer também que outras vantagens relacionadas ao uso dessa espécie são a existência de animais *inbred*, que definem as propriedades imunológicas e fisiológicas da doença (incluindo diferenças na suscetibilidade à alergia e características da mesma) e a ampla disponibilidade de reagentes para marcadores da resposta imune, em comparação a outras espécies animais.⁹ Apesar de

serem os camundongos os animais mais utilizados na pesquisa em asma, algumas peculiaridades encontradas nesses modelos não refletem a asma em humanos. As principais características presentes no modelo murino e ausentes em humanos incluem: (1) hiper-responsividade transitória de vias aéreas; (2) desconhecimento do exato papel da IgE e dos mastócitos na inflamação tecidual; (3) falta de um modelo similar de doença inflamatória crônica; (4) diferenças na anatomia pulmonar e na função eosinofílica entre os camundongos e os seres humanos. Mesmo com essas diferenças, o modelo murino desenvolve características inflamatórias semelhantes às da doença em seres humanos e tem sido útil nos testes de novos agentes terapêuticos que objetivam reduzir a inflamação pulmonar, a hipersecreção de muco, a hiper-responsividade das vias aéreas e a produção de IgE específica. Suas vantagens e desvantagens particularmente nos estudos de asma de origem atópica serão detalhadamente discutidas a seguir.

LINHAGENS ANIMAIS

A escolha da linhagem para estudos com sensibilização a um alérgeno é importante. Os camundongos do tipo BALB/c, linhagem mais utilizada em estudos de asma, produzem níveis elevados de anticorpos IgE contra ovalbumina (OVA), além de maiores concentrações de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) no lavado broncoalveolar, quando comparados, por exemplo, com animais da linhagem C57BL/6.¹⁰ Outras linhagens são pouco utilizadas em modelos de asma, por não serem muito sensíveis à sensibilização e ao desafio a alérgenos.¹¹

A sensibilização e o desafio com alérgenos em camundongos BALB/c resultam em uma forte resposta Th2 nos pulmões, com níveis de IgE específica para o antígeno, recrutamento e ativação de eosinófilos e redução do calibre das vias aéreas por ação de agentes broncoconstritores. Estudos realizados com animais transgênicos destacaram a importância das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, que posteriormente confirmaram seu envolvimento na fisiopatogenia da reação alérgica das vias aéreas na maioria dos pacientes com asma.¹²⁻¹⁶

Existem diversas linhagens de camundongos disponíveis no mercado hoje em dia. Por isso, é importante que se conheçam as características de cada uma delas no momento em que a pergunta do estudo é formulada. Os modelos *inbred* são aqueles cujo animal é cruzado entre irmãos por 10 gerações ou mais, até tornar-se 99% idêntico geneticamente.¹⁷ O fato de os animais possuírem as mesmas características genéticas reduz muito os fatores de confusão que são característicos de estudos em seres humanos. Além disso, os

camundongos *knockout*, aqueles onde o animal mutante não expressa um gene de particular interesse, permitem estudar a função específica desse gene. Atualmente, para a produção desse tipo de linhagem, é mais comum que se descubra e isole o gene normal e depois se determine sua função, substituindo-o *in vivo* por uma cópia inativa. Os animais são então intercruzados e detectados pela ausência de uma cópia intacta do gene de interesse.¹⁷ Dentre os exemplos mais comuns desse modelo em pesquisa biomédica estão aqueles com imunodeficiências graves, onde o gene ausente é necessário para o desenvolvimento de linfócitos T e B.¹⁸ Já os animais transgênicos são aqueles que carregam um DNA estranho que foi intencionalmente implantado em seu próprio DNA. Um dos exemplos mais conhecidos desse modelo é o que desenvolve esclerose lateral amiotrófica, no qual o camundongo carrega cópias inseridas de um gene humano que resulta na produção de uma enzima anormal.¹⁸

A possibilidade de escolha das linhagens torna os camundongos a espécie ideal para estudar muitas doenças, já que sua genética é detalhadamente entendida, além dos desfechos serem facilmente manipulados geneticamente.⁵ No início do século 21, o genoma do camundongo foi totalmente codificado, seguindo a codificação do genoma humano, com informações facilmente encontradas em bases de dados da internet.¹⁹

Outras variáveis importantes nos modelos experimentais são a idade e o sexo dos animais. As fêmeas são as mais comumente utilizadas, particularmente pela característica de convívio mais dócil e facilidade na manipulação, que facilita a realização das pesquisas em laboratório. Quanto à idade, a maioria dos protocolos de asma aguda são realizados com animais adultos. Do ponto de vista translacional, é importante saber que esses estudos não refletem a asma na criança.

Mesmo reconhecendo a importância do componente genético da asma, devemos lembrar que a asma em humanos, de característica poligênica complexa, é fortemente influenciada por características individuais de heterogeneidade genética e por fatores ambientais diversos.²⁰ Esse aspecto deve ser sempre considerado na interpretação dos estudos de asma realizados em animais isogênicos.

DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA ALÉRGICA AOS ANTÍGENOS

Além da preocupação com a escolha dos animais utilizados, o tipo de alérgeno e o protocolo de desenvolvimento de alergia nos camundongos devem ser criteriosamente considerados. Os modelos murinos não

desenvolvem resposta alérgica espontaneamente. Por isso, é necessário que se induza uma resposta alérgica “artificial” nas vias aéreas para reproduzir o quadro de asma.³ Camundongos são facilmente sensibilizados por um grande número de antígenos que normalmente não estão expostos no ambiente, incluindo a OVA, que é o mais utilizado, e alguns outros alérgenos humanos, como o ácaro da poeira e fungos.

Antígenos utilizados

A OVA é o antígeno mais popular na pesquisa de asma em camundongos, por se tratar de uma substância disponível comercialmente, de fácil manipulação e com a qual o camundongo de laboratório não tem contato ambiental. A OVA é a principal proteína encontrada na clara do ovo (cerca de 60% do conteúdo proteico), fazendo parte da superfamília das serpinas. Sua função ainda é desconhecida, embora se acredite que ela funcione como um armazenamento protéico.²¹ É uma proteína muito importante em pesquisa, particularmente em imunologia. Alguns autores não consideram a OVA um alérgeno ideal para modelos de asma, pois não é um alérgeno comum em asma em humanos e costuma desencadear tolerância imunológica em camundongos em exposição crônica. Desta forma, recentemente, outros alérgenos têm sido testados e apresentados como alternativas para modelos experimentais em asma, como o *Dermatophagoides pteronyssinus*.^{22,23}

Adjuvante

Os adjuvantes, como o hidróxido de alumínio, promovem uma ativação mais intensa da resposta Th2, quando o sistema imune é exposto a um antígeno.²⁴ O uso de hidróxido de alumínio em modelos de resposta pulmonar alérgica em murinos é constante na metodologia das publicações científicas da área. No entanto, nos últimos anos, o uso de adjuvante juntamente com OVA tem sido discutido. Tem se questionado a necessidade do uso dessa substância nos protocolos murinos de asma, por ser um método artificial, quando comparado à fisiopatogenia de doenças alérgicas em humanos. Em um estudo realizado por Conrad et al.,²⁵ com protocolo de OVA subcutânea sem o uso de adjuvante, os autores concluíram que esse protocolo resulta em uma resposta inflamatória similar ao protocolo padrão (com adjuvante), usado na maioria dos estudos que investigam os mecanismos de alergia respiratória em camundongos. Em estudo piloto, realizado por nosso grupo de pesquisa, a contagem total de células (leucócitos e eosinófilos) no lavado broncoalveolar em um grupo sensibilizado com OVA sem adjuvante foi semelhante ao grupo com

adjuvante (dados não publicados). É aconselhável que protocolos sem adjuvante sejam estabelecidos e aceitos pela comunidade científica e que futuros estudos experimentais em asma abandonem a utilização de adjuvante.

Dose e via de administração do alérgeno (sensibilização e desafio)

Além da escolha do tipo de animal e do alérgeno, a dose do antígeno e a via de administração também são variáveis importantes. Existem diversas vias de administração para sensibilização e desafio do alérgeno, tais como: intraperitoneal, subcutânea, intranasal, inalatória ou intratraqueal. As mais comumente utilizadas são a intraperitoneal (sensibilização) e a intranasal (desafio).

A sensibilização à OVA é adquirida através de mais de uma exposição por via intraperitoneal. A dose intraperitoneal para sensibilização varia entre 1 µg e 100 µg (volume de 200 µl) a cada sensibilização, dependendo do estudo, porém doses entre 10 µg e 50 µg são frequentemente empregadas e as mais aconselhadas.¹⁰ Em um estudo realizado por Sakay et al., os níveis de IgE, a intensidade da inflamação pulmonar e a quantidade de eosinófilos no lavado broncoalveolar foram inversamente proporcionais à dose de sensibilização.²⁶

A OVA administrada por via intranasal é aspirada para o pulmão somente durante anestesia geral do animal, quando é atingida a inibição dos reflexos da via aérea superior. Este é um procedimento fácil de ser realizado, sem complicações para o animal, exceto o pequeno estresse da anestesia (Figura 1).



Figura 1. Técnica de administração de ovalbumina intranasal sob anestesia geral.

O volume da solução instilada no desafio intranasal deve ser de 50 µl para que ocorram aspiração e distribuição pulmonar adequadas.²⁷ O desafio com OVA por inalação através de nebulização também pode ser utilizado. Muitos autores argumentam que esse deve ser o método de escolha, pois o desafio é mais similar à forma como pacientes com asma são expostos a alérgenos, e não é necessário o procedimento anestésico, não gerando estresse aos animais, o que é particularmente importante em protocolos de exposição crônica aos alérgenos. No entanto, o custo desse método é mais elevado devido à maior quantidade de OVA utilizada por cada desafio, o que deve explicar seu uso mais limitado.¹⁰

A resposta inflamatória pulmonar do modelo com OVA em camundongos BALB/c reproduz alguns aspectos característicos da asma em humanos. No entanto, dois achados merecem discussão sobre a validade desse modelo. Em primeiro lugar, o influxo elevado de leucócitos nas vias aéreas dos camundongos apresenta um predomínio significativo de eosinófilos. O número de eosinófilos no lavado broncoalveolar atinge números entre 40-60% das células inflamatórias.^{28,29} Em segundo lugar, a análise histológica de pulmão desses animais demonstra um padrão de inflamação eosinofílica alveolar. Essas duas características do modelo murino de OVA não ocorrem em pacientes com asma, tendo sido motivo de debate e questionamento sobre a validade e necessidade de mudança dos protocolos de asma em camundongos.³

Protocolo de resposta aguda versus resposta crônica

Um dos temas mais discutidos quanto aos méritos do protocolo de resposta pulmonar alérgica com OVA em camundongos é a ausência do modelo crônico da doença. A asma, em geral, é caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, com remodelamento brônquico em alguns pacientes, que inclui fibrose subepitelial, metaplasia e hiperplasia de células caliciformes, hipertrofia de musculatura lisa e hipersecreção brônquica.⁶ Como consequência, ocorre uma alteração persistente na estrutura da parede da via aérea, causando redução não reversível de fluxos expiratórios. Essas alterações não são encontradas nos modelos murinos de OVA de inflamação aguda, que são os mais utilizados atualmente.³⁰⁻³⁴

Os protocolos de asma crônica em camundongos envolvem exposições ao antígeno por um período de pelo menos oito semanas. Porém, muitas vezes, o desafio de longa duração induz resposta inflamatória granulomatosa ou tolerância imunológica, com

inibição da inflamação, hiper-responsividade brônquica e mudanças na estrutura da via aérea.³⁵⁻³⁷ Dessa maneira, diferenças nos protocolos podem ter um efeito significativo nos desfechos escolhidos em um experimento.¹⁰ Sabe-se que o modelo murino, bem como outros modelos ativamente sensibilizados, particularmente com OVA, responde ao desafio inalado inicialmente, mas com o seguimento do protocolo, o animal geralmente torna-se tolerante ao alérgeno.^{34,38,39} Por isso, muitos pesquisadores optaram historicamente por protocolos de resposta aguda.

Devido ao desenvolvimento de tolerância imunológica, a intensidade da resposta inflamatória reduz-se após repetidos desafios com OVA, tornando os protocolos de uso crônico de OVA inadequados para a avaliação da lesão tecidual crônica da asma.¹⁰ Alguns pesquisadores utilizaram outros tipos de alérgenos, relevantes ao ambiente, para estabelecer uma exposição crônica, tal como ácaro domiciliar. Além do alérgeno, tanto a linhagem quanto a via de administração são fatores determinantes na indução da tolerância imunológica.³

Os modelos de exposição crônica em camundongos parecem ser a escolha ideal para estudos que envolvam o papel específico de certos tipos celulares e de citocinas e mediadores inflamatórios. Esses modelos podem ainda promover um sistema mais adequado para a avaliação pré-clínica de novos agentes terapêuticos.²¹ No entanto, ainda não foi encontrado nenhum protocolo de exposição crônica que reflita de forma mais abrangente a asma em humanos. A Figura 2 representa os protocolos de resposta pulmonar alérgica aguda e crônica mais comumente utilizados. Estes protocolos são os utilizados pelo grupo de pesquisa dos autores.

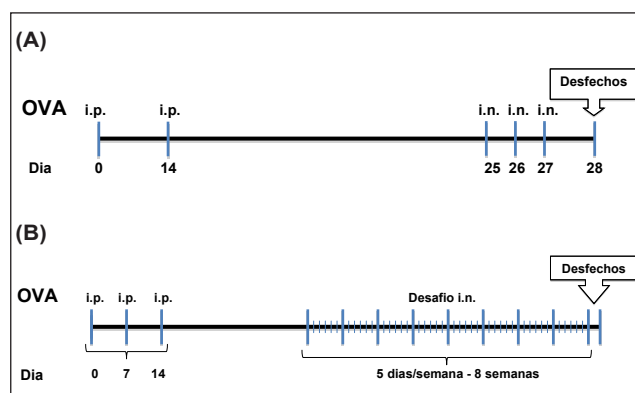


Figura 2. Protocolo de resposta pulmonar alérgica aguda (A) e crônica (B) em modelo murino. OVA: ovalbumina; i.p.: intraperitoneal; i.n.: intranasal.

Aspectos translacionais

Apesar do modelo animal em asma ser, por motivos éticos, a ferramenta que permite investigações mais específicas dos mecanismos de doença e de testes pré-clínicos para novas terapias, pesquisadores reconhecidos e respeitados mundialmente concordam em que a extrapolação dos dados dos estudos relacionados à resposta pulmonar alérgica em modelo murino deve ser cuidadosamente interpretada.^{1,5,10}

O modelo murino ocupa uma posição privilegiada nas pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação da asma. Porém, é importante lembrar que existem diferenças entre as respostas desenvolvidas pelo camundongo e pelo ser humano. Essas diferenças podem ser explicadas por distinções genéticas, tipo de alérgeno e via/dose de administração.⁸ Além disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado que inúmeros fatores ambientais influenciam a prevalência e o comportamento da asma de forma importante.^{1,34} Dessa forma, o modelo animal ideal deveria também reproduzir as variáveis epidemiológicas (poluição, tabagismo, infecções, etc.), o que tornaria mais difícil a realização de estudos em animais de laboratório.⁶

Inúmeros pontos devem ser discutidos e testados para que mudanças nos protocolos de modelos murinos de asma resultem em uma aproximação destes com a doença em humanos. Para resumir, sugerimos alguns fatores que deveriam ser considerados e implementados para melhoria das pesquisas com camundongos em asma: 1) testes com animais em diferentes faixas etárias; 2) utilização de diferentes alérgenos (OVA, ácaro, fungo); 3) exclusão do uso de adjuvante; 4) inclusão de protocolos de exposição aguda e crônica; e 5) redução de doses do alérgeno no desafio (para tentar reduzir a intensidade da resposta eosinofílica pulmonar).

CONCLUSÕES

É importante que o modelo animal seja válido e reflita os aspectos clínicos da asma, de forma mais próxima possível da doença humana. Nos últimos anos, inúmeros grupos de pesquisa no mundo têm buscado novos modelos experimentais com o objetivo de refinar e melhorar os protocolos já existentes, para que ocorra uma diminuição das diferenças entre os modelos murinos e a asma em humanos. Acredita-se que essa busca deverá aperfeiçoar os aspectos translacionais da pesquisa em asma atópica, permitindo novas descobertas mecanísticas e melhores modelos de testes pré-clínicos dessa doença que aflige milhões de pessoas no mundo todo. Na opinião dos autores,

em curto prazo, dificilmente haverá um modelo que abranja todos os aspectos translacionais relevantes da doença. Provavelmente, mais de um protocolo deverá ser utilizado para responder perguntas científicas, particularmente relacionadas à prevenção e ao tratamento da asma, incluindo experimentos de fase aguda e crônica, com exposição a diferentes alérgenos e em diferentes faixas etárias, reproduzindo da forma mais próxima possível as características da asma em crianças e adultos.

REFERÊNCIAS

1. Fulkerson PC, Rothenberg ME, Hogan SP. Building a better mouse model: experimental models of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1251-3.
2. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol*. 2006;32(Supl 7):s447-s474.
3. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*. 2008;1:213-20.
4. Keir S, Page C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21:721-30.
5. Zozky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:973-88.
6. Krug N, Rabe KF. Animal models for human asthma: the perspective of a clinician. *Curr Drug Targets*. 2008;9:438-42.
7. Kucharewicz I, Lukaszuk AB, Buczek W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol Rep*. 2008;60:783-8.
8. Torres R, Picabo C, Mora F. Use of the mouse to unravel allergic asthma: a review of the pathogenesis of allergic asthma in mouse models and its similarity to the conditions in humans. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:141-52.
9. Filkelman FD, Karp MW. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:603-6.
10. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*. 2008;9:485-94.
11. Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, et al. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:32-42.
12. Elias JA, Lee CG, Zheng T, et al. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest*. 2003;111:291-7.
13. Pauwels RA, Bruselle GJ, Kips JC. Cytokine manipulation in animal models of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:78-81.
14. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996;183:195-201.
15. Fish SC, Donaldson DD, Goldman SJ, et al. IgE generation and mast cell effector function in mice deficient in IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 2005;174:7716-24.
16. Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:173-86.
17. Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

18. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. The laboratory mouse. Boca Raton: CRC Press LLC; 2001.
19. Yoshiki A, Ike F, Mekada K, et al. The mouse resources at the RIKEN bioresource center. *Exp Anim.* 2009;58:85-96.
20. Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol.* 2006;57(suppl 2):41-4.
21. Huntington JA, Stein PE. Structure and properties of ovalbumin. *J Chromatogr.* 2001; 756:189-98.
22. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:378-85.
23. Mehlhop PD, van der Rijn M, Goldberg AB, et al. Allergen induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:1344-9.
24. 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.
25. Conrad ML, Yildirim AÖ, Sonar SS, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy.* 2009;39:1246-54.
26. Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, et al. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol.* 1999;118:9-15.
27. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, et al. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:833-9.
28. Trifilieff A, Al-Hasim A, Corteling R, et al. Abrogation of lung inflammation in sensitized STAT6-deficient mice is dependent on the allergen inhalation procedure. *Br J Pharmacol.* 2000;130:1581-8.
29. Zosky GR, von Garnier C, Stumbles PA, et al. The pattern of methacholine responsiveness in mice is dependent on antigen challenge dose. *Respir Res.* [Internet] 2004 Sept 23 [citado 2010 23 set];5:15 [10 p.]. Disponível em: <http://respiratory-research.com/content/pdf/1465-9921-5-15.pdf>
30. Takayama G, Arima K, Kanaji T et al. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma down-stream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:98-104.
31. Tang MLK, Wilson JW, Stewart AG, et al. Airway remodeling in asthma: current understanding and implications for future therapies. *Pharmacol Ther.* 2006;112:474-88.
32. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 2006;86:245-78.
33. Young HWJ, Sun CX, Evans CM, et al. A(3) adenosine receptor signaling contributes to airway mucin secretion after allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;35:549-58.
34. Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice-pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27:267-72.
35. Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, et al. Shifts in lung lymphocytes profile correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol.* 1999;154:1911-21.
36. 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.
37. Jungsuwadee P, BenkovszkyM, 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.
38. 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.
39. 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.