

---

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E  
SAÚDE DA CRIANÇA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Andréa Mendonça Rodrigues**

**Nova proposta de modelo murino de asma aguda: utilização de protocolo  
curto sem adjuvante com sensibilização a ovalbumina.**

**Porto Alegre  
2011**

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**Nova proposta de modelo murino de asma aguda:  
utilização de protocolo curto sem adjuvante com  
sensibilização a ovalbumina.**

Andréa Mendonça Rodrigues

Porto Alegre, 2011

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**Nova proposta de modelo murino de asma aguda:  
utilização de protocolo curto sem adjuvante com  
sensibilização a ovalbumina.**

Andréa Mendonça Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade  
de Medicina da PUCRS para obtenção de título de  
Mestre em Medicina/Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Porto Alegre, 2011

---

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

R696n Rodrigues, Andrea Mendonça

Nova proposta de modelo murino de asma aguda: utilização de protocolo curto sem adjuvante com sensibilização a ovalbumina / Andrea Mendonça Rodrigues. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

64 f.: il. gráf. tab. Inclui um artigo científico para submissão à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. ASMA. 2. REAÇÃO DE FASE AGUDA. 3. ADJUVANTES IMUNOLÓGICOS. 4. OVALBUMINA. 5. PROTOCOLOS. 6. FEMININO. 7. ADULTO. 8. MURINOS. 9. CAMUNDONGOS ENDOGÂMICOS BALB C. 10. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 11. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Título.

C.D.D. 616.23

C.D.U. 616.248:599.323.4(043.3)

N.L.M. WF 553

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

---

---

---

## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo deste tempo em que passei no laboratório, convivendo com diferentes pessoas, muitas foram marcantes e ficarão na memória. Fiz amigos e grandes colegas de trabalho.

Agradeço inicialmente a todos do laboratório de Respirologia Pediátrica do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, que me ensinaram os primeiros passos na pesquisa, além de estarem sempre presentes, quando necessário, nas cirurgias, procedimentos e ainda respondendo aos meus questionamentos. Em especial, agradeço a Ana Cláudia Pereira, Alisson Schleich, Caren de Oliveira, Gustavo Leivas Barbosa, Larissa Masiero, Lucien Gualdi, Nailê Nuñez, Raquel Cao e Rodrigo Godinho de Souza.

A toda equipe de pneumologia pediátrica: Taísa Paim, Prof. Dr. Leonardo Pinto, Prof. Dr. Marcus Jones, Prof. Dr. Paulo Marostica, Prof. Dr. Renato Stein.

Agradeço ao médico patologista Diego Uchoa pela grande ajuda na análise dos meus dados.

A CAPES pela bolsa de incentivo a pesquisa.

À amiga e colega de profissão Camila Parreira, que me acompanha há 3 anos, desde minha chegada ao Grupo de Pneumologia Pediátrica do Hospital São Lucas da PUCRS.

À Marilaine Becker e Carla Rothmann que por tantas vezes me compreenderam nesta jornada dupla de profissional e pesquisadora, ajudando-me no que foi preciso com os pequenos imprevistos rotineiros.

---

---

---

À Rita Mattiello e Edgard Sarria, pela ajuda indescritível que obtive dos mesmos, me dando suporte técnico e emocional no período mais difícil do meu trabalho.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Paulo Pitrez, o qual sempre esteve presente durante todos os processos de evolução de meu mestrado, ajudando-me com sua inabalável paciência e dedicação à pesquisa e seus alunos.

Aos meus pais, Leila e Maurício, que, mesmo distantes, sempre me deram suporte emocional e me apoiaram em todas as minhas decisões. À minha irmã Adriana, excelente ouvinte, quando necessitei, e a todas minhas amigas, que sempre compreenderam minhas ausências.

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| <b>CTC</b>   | Contagem total de células                   |
| <b>Ctl +</b> | Controle positivo                           |
| <b>Ctl -</b> | Controle negativo                           |
| <b>DPBS</b>  | <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> |
| <b>EPO</b>   | Peroxidase eosinofílica                     |
| <b>HE</b>    | Hematoxilina-eosina                         |
| <b>IgE</b>   | Imunoglobulina E                            |
| <b>IL</b>    | Interleucina                                |
| <b>IN</b>    | Intranasal                                  |
| <b>IP</b>    | Intraperitoneal                             |
| <b>LBA</b>   | Lavado broncoalveolar                       |
| <b>OVA</b>   | Ovalbumina                                  |
| <b>SC</b>    | Subcutâneo                                  |
| <b>Th1</b>   | Linfócito T auxiliar do tipo 1              |
| <b>Th2</b>   | Linfócito T auxiliar do tipo 2              |

---

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1. Anestesia geral em camundongos utilizando câmara anestésica. Os camundongos recebem isofluorano por via inalatória, para posterior instilação de OVA por via nasal (desafio intranasal)..... 17
- Figura 2. Instilação de OVA intranasal em camundongo BALB/c, após anestesia geral em câmara anestésica..... 18

### CAPÍTULO III

- Figura 1. Protocolos utilizados para indução de reposta inflamatória aguda em pulmões de camundongos BALB/c fêmeas. OVA: ovalbumina; s.c.: subcutânea; i.n.: intranasal.....47
- Figura 2. Comparação da contagem total de células e da citologia diferencial no lavado broncoalveolar (número absoluto e percentual) entre os grupos estudados ....54
- Figura 3. Análise histológica dos grupos de camundongos estudados. Presença de intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular (de A-F, setas pretas) em todos os grupos sensibilizados.....56
- Figura 4. Análise do ensaio de atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar entre os grupos estudados. Não houve significância estatística entre os grupos estudados .....57
-



---

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO III**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Divisão dos grupos de camundongos estudados de acordo com intervenção e dosagem de ovalbumina para desafio intranasal. .... | 46 |
|---|----|



---

## RESUMO

**Introdução:** Várias limitações têm sido levantadas em estudos de asma utilizando modelos murinos agudos sensibilizados com ovalbumina (OVA), mas este modelo é ainda amplamente usado, ainda mantendo sua importância em estudos pré-clínicos. Algumas limitações encontradas são o uso de adjuvante e os longos períodos de sensibilização.

**Objetivos:** Testar se a sensibilização com OVA em um período curto, sem adjuvante, induziria uma resposta pulmonar eosinofílica em camundongos similar aos protocolos já previamente estabelecidos.

**Métodos:** Fêmeas adultas de camundongos BALB/c foram utilizadas e divididas em grupos de acordo com o número de sensibilizações com OVA (uma ou duas vezes, OVA: 20 µg) e o número(duas ou três vezes)/dosagem(40 µg e 100 µg) de desafios intranasais. O protocolo mais curto (10 dias) consistiu de uma sensibilização subcutânea e três desafios com OVA (100 µg). Contagem total (CTC) e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA), ensaio da peroxidase eosinofílica (EPO) do tecido pulmonar e histopatologia (HE) dos pulmões foram realizados 24 horas após o último desafio com OVA.

**Resultados:** Contagem celular do LBA, EPO do tecido pulmonar e alterações inflamatórias da histologia pulmonar não foram diferentes entre os grupos estudados. O protocolo mais curto induziu uma resposta eosinofílica pulmonar à OVA semelhante ao grupo controle, ocorrendo o mesmo com os outros grupos.

**Conclusão:** O uso de sensibilização subcutânea com OVA, sem adjuvante, resulta em uma significativa resposta pulmonar alérgica, permitindo sua utilização em protocolos de duração mais curta. Nossos achados sugerem que este protocolo pode ser utilizado como teste pré-clínico de primeira linha para pesquisa de novos fármacos, reduzindo custo, tempo e uso de adjuvante.

**Palavras-chave:** asma, adjuvante, protocolo, modelo agudo

---

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Some limitations have been raised over the murine models with ovalbumin (OVA) sensitization in asthma research. However, this model is still widely used and the acute OVA protocol in mice still plays a role in pre-clinical investigation. The use of adjuvant and long sensitization periods are some of the limitations raised.

**Aims:** We have tested whether a shorter period of subcutaneous sensitization with OVA, with no adjuvant, induces a similar eosinophilic pulmonary response in mice, when compared with previous well-established control protocols.

**Methods:** Adult female BALB/c mice were used and divided into groups, according to the number of OVA sensitizations (once or twice, OVA: 20 µg) and the number (two or three times) /dosage(40 µg and 100 µg) of intranasal OVA challenge. The shorter protocol (10 days-length) consisted of one subcutaneous OVA sensitization and three OVA challenges (100 µg). Total (TCC) and differential cell counts from bronchoalveolar lavage (BAL), eosinophil peroxidase (EPO) from lung tissue and histopathology (HE) of the lungs were performed 24 hours after the last OVA challenge.

**Results:** Cell counts from BAL, EPO from lung tissue and histological lung abnormalities were not different between the groups studied. The shorter protocol induced a similar allergic lung response to OVA, when compared with the positive control, the same occurring with the other groups.

**Conclusion:** We concluded that the use of one subcutaneous OVA sensitization elicit a strong allergic pulmonary response, free of adjuvant, in a 10-day-length protocol. Our findings suggest that this protocol may be used a first-line pre-clinical test, reducing cost and time of experiments, and avoiding the use of artificial adjuvants.

**Key words:** asthma, adjuvant, protocol, acute model

---

---

---

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

|                   |    |
|-------------------|----|
| INTRODUÇÃO .....  | 12 |
| REFERÊNCIAS ..... | 20 |

### CAPÍTULO II

|                            |    |
|----------------------------|----|
| ARTIGO DE REVISÃO .....    | 23 |
| RESUMO .....               | 25 |
| ABSTRACT .....             | 26 |
| INTRODUÇÃO .....           | 27 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... | 37 |
| REFERÊNCIAS .....          | 38 |

### CAPÍTULO III

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| ARTIGO ORIGINAL .....           | 40 |
| INTRODUÇÃO .....                | 42 |
| MÉTODOS.....                    | 44 |
| RESULTADOS .....                | 52 |
| DISCUSSÃO.....                  | 58 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |

---

---

## **INTRODUÇÃO**

Em 2008, proveniente de Manaus/AM, iniciei minha residência médica de pneumologia pediátrica no Hospital São Lucas da PUCRS. Escolhi este serviço porque, após pesquisar os maiores centros do país, o julguei ser um dos mais completos em termos de abrangência de doenças respiratórias da especialidade, de competência profissional dos preceptores e ainda por haver um grupo de pesquisa com reconhecimento internacional.

Durante os dois anos em que estive como residente, apesar de não ter me envolvido diretamente nas atividades de pesquisa, iniciei com alguns interesses em áreas específicas, porém a que mais me chamou atenção foi a de estudos com modelos experimentais em asma. Achei que a contribuição desta linha de pesquisa é de suma importância para a ciência, pois, através destas pesquisas podemos conhecer melhor mecanismos da doença, bem como descobrir e testar novos fármacos para tratamento e quem sabe prevenção precoce desta doença. Ainda, durante a residência, fiz a inscrição para seleção de Mestrado no Curso de Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS, obtendo êxito na seleção, comecei a cursá-lo ainda no meu último semestre, sendo orientada pelo Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez. Tive então meus primeiro contatos com

---

camundongos, aprendi a manuseá-los, as diferentes técnicas cirúrgicas, e ainda a utilizar instrumentos do laboratório, conhecimentos novos, todos muito instigantes para mim.

Sendo um dos interesses do grupo do Prof. Pitrez a descoberta de novas terapias para tratamento ou inibição da asma, iniciei meu mestrado testando um bioproduto, a frutose 1,6-bifosfato, a qual já vinha sendo estudada pelo Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pesquisador da PUCRS, na inibição da resposta imune celular em camundongos. Não obtivemos sucesso em um estudo piloto testando o efeito antiinflamatório deste bioproduto em modelo murinho de asma. No entanto, a partir desta frustrada experiência, veio-nos a idéia de encurtar os nossos protocolos de resposta aguda, pois precisávamos de pelo menos 28 dias para testes de terapias, o que nos consumia tempo e trabalho. A partir também de um artigo trazido pelo Prof. Pitrez, em que não se utilizava alum como adjuvante no modelo murinho de asma (o alum potencializa artificialmente a resposta imune e a produção de citocinas de característica alérgica), com a utilização de ovalbumina (OVA) por via subcutânea (SC),<sup>1</sup> houve a idéia de se testar protocolos mais curtos com OVA SC. Se houvesse semelhança com o protocolo modelo amplamente utilizado na literatura, poderíamos além de reduzir o tempo de experimento, não fazer a utilização do adjuvante artificial.

Além disso, tendo formação clínica e participando do Ambulatório de Asma Infantil do HSL/PUCRS com o Prof. Pitrez, lidamos rotineiramente com pacientes asmáticos e com os desafios dos seus tratamentos. Assim, neste cenário, meu orientador solicitou-me que fizesse a revisão da literatura de artigos envolvendo as evidências de aumento da mortalidade da asma associado ao uso de fenoterol. Este trabalho foi

---

estimulante durante meu Mestrado, consistindo na revisão bibliográfica sobre o tema, desde o lançamento do fármaco no mercado até sua proibição ou restrição em alguns países, bem como a avaliação da metodologia dos artigos e a comparação dos dados encontrados. Este artigo, com um tema dormente no Brasil nas duas últimas décadas, foi incluído nesta dissertação, tendo sido aceito para submissão e avaliação pelo Jornal Brasileiro de Pneumologia.

Deste modo, em meu Mestrado, meus estudos foram concentrados em asma, realizando um artigo de revisão sobre os riscos do uso de fenoterol no tratamento da mesma, e um artigo original, avaliando o uso de novos protocolos para indução de resposta aguda pulmonar alérgica em camundongos.

### **Asma e modelos murinos**

Estudos sobre asma são justificados por ser uma doença crônica das vias aéreas inferiores que acomete cerca de 300 milhões de pessoas no mundo, com alta morbidade e mortalidade em muitos países, chegando a cerca de 6 mortes por dia no Brasil,<sup>2</sup> possui importância econômica na população, necessitando de investimentos em novos tratamentos e quem sabe, em drogas que a inibirão de forma precoce. A asma é uma doença caracterizada pela infiltração de células CD4+ T-helper 2 (Th2) e eosinófilos nas vias aéreas, associada à elevação de imunoglobulina (Ig) E alérgeno-específica no plasma. As células Th2 são responsáveis pela secreção de interleucinas (IL)-4 e IL-5,

---

---

que estimulam a síntese de IgE e o recrutamento/ativação de eosinófilos, respectivamente.<sup>3</sup> Assim, para a pesquisa de novos fármacos para tratamento da doença,<sup>4</sup> bem como para melhor entendimento da fisiopatogenia da mesma, são utilizados modelos animais, para melhor entendimento dos processos de mecanismo de doença imunológicos, tanto em nível celular quanto molecular, encontrados em sistemas imunes e respiratórios intactos, como em modelos animais.<sup>5,6</sup>

Nenhum animal de laboratório desenvolve características fenotípicas exatamente semelhantes à asma em humanos,<sup>7</sup> com inflamação crônica das vias aéreas, caracterizada por uma resposta imune Th2 (elevados níveis de IgE alérgeno-específicos, produção de IL-4, IL-5 e IL-13, e inflamação eosinofílica).<sup>8-10</sup> Mesmo assim, modelos animais tem sido desenvolvidos e utilizados, com processo de sensibilização a antígenos, e posterior desafio das vias aéreas, a fim de desencadear uma resposta pulmonar alérgica semelhante à asma.<sup>6</sup> Dentre os animais estudados, o camundongo isogênico é o mais popular, principalmente das linhagens BALB/c e C57BL/6, em virtude do detalhado conhecimento da sua genética e pela forte resposta Th2 desenvolvida em seus pulmões, quando expostos a antígenos específicos.<sup>6</sup> Este modelo, inicialmente demonstrado no início da década 90 em modelo de asma aguda,<sup>11</sup> caracteriza-se por uma produção maior de IL-4 e IL-5 no lavado bronco-alveolar (LBA) quando sensibilizados, bem como níveis elevados de IgE específica.<sup>4, 12, 13</sup> No modelo de asma aguda, para que ocorra a resposta inflamatória pulmonar em camundongos, realizamos duas fases de exposição a um antígeno: sensibilização e desafio.

---



---

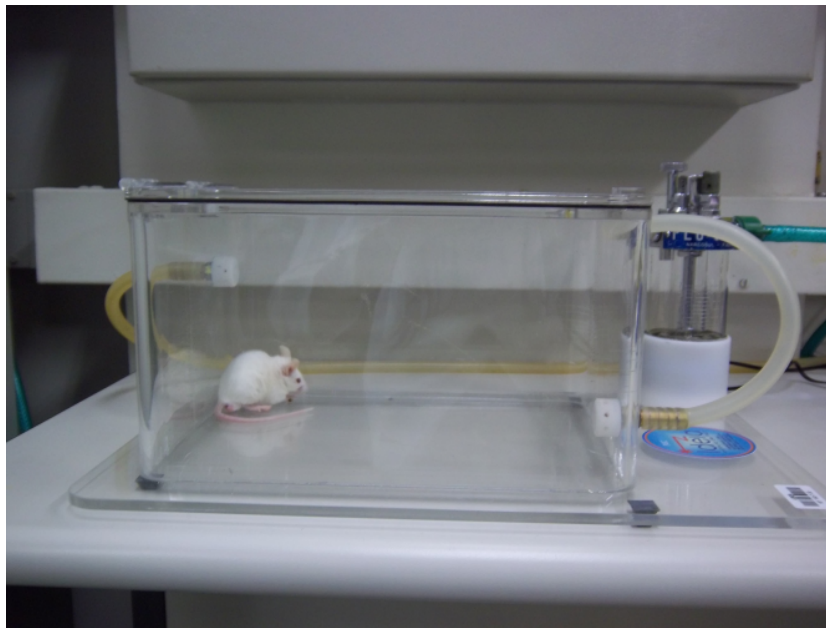
Para a sensibilização do modelo estudado, o método mais amplamente utilizado baseia-se na injeção intraperitoneal de OVA,<sup>13</sup> proteína esta originada do ovo da galinha, de tamanho grande (45 kDa) e monovalente,<sup>14</sup> que pode ser utilizada em doses tão baixas quanto 1 µg, até 8.000 µg por animal.<sup>12</sup> No entanto, doses entre 10 µg e 50 µg são mais amplamente empregadas, por haver uma melhor resposta inflamatória demonstrada em alguns estudos.<sup>15</sup> Sensibilização intranasal é outra rota alternativa descrita, mas a produção de IgE não é tão importante.<sup>4, 13, 16, 17</sup>

Juntamente com uso de OVA, os modelos animais de sensibilização intraperitoneal fazem uso de adjuvantes para potencializar a resposta imune e a produção de citocinas Th2. O adjuvante mais utilizado é o hidróxido de alumínio (alum) na dose entre 1 µg e 40 µg.<sup>12</sup> O adjuvante ativa uma classe diferente de modelo de receptores de reconhecimento (PRRs), os receptores intracelulares NOD-like, que liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-18 e IL-33, e, de maneira ainda desconhecida, ativam o sistema imune através da via Th2.<sup>18</sup> Em adição a este mecanismo, ele ainda libera ácido úrico, que está presente na mediação imunológica via maturação de células dendríticas e co-estimulação de moléculas de expressão.<sup>19, 20</sup>

Para o desafio pulmonar, existem inúmeros protocolos descritos, com uma grande diversidade de modelos, sendo a OVA administrada por via intratraqueal ou intranasal os mais utilizados.<sup>12</sup> Para a realização do desafio intranasal, é necessário que o camundongo seja submetido à anestesia geral, usualmente por inalação de isofluorano ou halotano, pois a instilação intranasal dos mesmos sem anestesia resulta em ausência de aspiração pulmonar do alérgeno<sup>21</sup> (Figuras 1 e 2). Na maioria dos modelos murinos, o

---

desafio pulmonar é de curta duração, levando em média de 4 a 8 dias consecutivos, a fim de que resulte em hiperresponsividade brônquica e inflamação eosinofílica, aumento dos níveis de IgE específica e hiperplasia de células caliciformes. No entanto, neste caso, verifica-se uma inflamação perivascular e parenquimatosa, não ocorrida em humanos.<sup>12</sup>



**Figura 1.** Anestesia geral em camundongos utilizando câmara anestésica. Os camundongos recebem isoflurano por via inalatória, para posterior instilação de OVA por via nasal (desafio intranasal).



**Figura 2. Instilação de OVA intranasal em camundongo BALB/c, após anestesia geral em câmara anestésica.**

Um dos modelos murinos mais utilizados baseia-se no uso de camundongos fêmeas adultos (6-8 semanas de vida) da linhagem BALB/c, por serem mais dóceis, que são sensibilizadas com duas doses de OVA e alum, por via intraperitoneal, com intervalo de 14 dias, e posterior desafio intranasal de OVA.<sup>14</sup> No entanto, um estudo publicado em 2009 por Conrad et al.,<sup>1</sup> empregando fêmeas adultas de BALB/c, demonstrou que o uso de um protocolo sem adjuvante com sensibilização subcutânea com OVA nos dias 0, 7 e 14, era tão eficaz quanto o protocolo utilizando OVA intraperitoneal, além de demonstrar que o alum altera o comportamento dos animais. A partir deste estudo, demonstrou-se que um modelo sem adjuvante é viável do ponto de vista prático em estudos experimentais de asma.

---

Apesar do modelo experimental com camundongos ser, atualmente, o modelo de escolha para estudos mecanísticos e pré-clínicos de asma, devemos levar em consideração as grandes diferenças na inflamação brônquica do mesmo em relação ao ocorrido em humanos. Enquanto a porcentagem de eosinófilos no LBA de pessoas asmáticas chega a 1-3%, nos modelos com OVA, este consiste em 40-80%, com número total de células do LBA muito elevado, chegando a 20.000 cél/ml, havendo ainda de 20-100% de macrófagos, <1% de neutrófilos e 1-20% de linfócitos.<sup>11, 12</sup> Ainda há outras alterações que devemos levar em consideração, como as alterações histológicas da inflamação (parenquimatosas e vasculares ao invés de restritas as vias aéreas de condução, como em humanos), que resolvem espontaneamente em 3 semanas, no papel ainda não muito claro da IgE específica e mastócitos, na diferença da anatomia pulmonar (largo diâmetro das vias aéreas em relação ao tamanho corporal, que pode explicar a ausência de sintomas evidentes nos animais) e na diferença da função dos eosinófilos entre humanos e camundongos.<sup>4, 11, 12, 22, 23</sup> Devido a estas grandes diferenças existentes, por vezes os resultados testados nesses animais não é encontrado da forma desejada em pacientes com asma, como o caso de bloqueadores de IL-5, que após eficácia demonstrada em camundongos, não obteve resultados promissores em humanos.<sup>4, 22, 23</sup>

Concluindo esta introdução, o estudo original da minha dissertação tem como objetivo auxiliar para que os modelos animais em asma tornem-se mais factíveis e semelhantes à asma em humanos, excluindo o uso de adjuvante, assim como reduzindo o tempo de realização dos protocolos, a fim de que se tenha um modelo de resposta alérgica adequado, utilizando doses menores de OVA, em um menor espaço de tempo.

---

---

**REFERÊNCIAS**

1. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kilic A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. [Comparative Study]. 2009 Aug;39(8):1246-54.
  2. Pitrez PMC, Stein, R.T., Martinez F.D. The Global Burden of Asthma. In: Taussig LM, Landau, L.I., Le Souëf, P.N., Martinez, F.D., Morgan, W.J., Sly, P.D., editor. *Pediatric Respiratory Medicine*. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 779-81.
  3. Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Dec;138(4):298-304.
  4. Bates JH, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2009 Sep;297(3):L401-10.
  5. Shichijo M, Inagaki N, Nakai N, Kimata M, Nakahata T, Serizawa I, et al. The effects of anti-asthma drugs on mediator release from cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Oct;28(10):1228-36.
  6. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. [Review]. 2007 Jul;37(7):973-88.
  7. Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res*. [Review]. 2000 Dec;49(12):639-54.
  8. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. [Review]. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B12-7.
  9. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2002;53:477-98.
  10. Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. [Editorial Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 2008 Mar;121(3):603-6.
  11. Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2006 Jun;57 Suppl 2:41-4.
  12. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 Jun;9(6):485-94.
  13. Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, Chi EY, Henderson WR, Jr., Lewis DB. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Feb;155(2):661-9.
-

- 
14. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma - chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 Jun;9(6):495-502.
  15. Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol*. 1999 Oct;118(1):9-15.
  16. Kurup VP, Mauze S, Choi H, Seymour BW, Coffman RL. A murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis with elevated eosinophils and IgE. *J Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 1992 Jun 15;148(12):3783-8.
  17. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. [Review]. 2003 Aug;22(2):374-82.
  18. Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy*. [Editorial]. 2008;38:1572-5.
  19. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Apr 14;205(4):869-82.
  20. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Oct 2;425(6957):516-21.
  21. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Apr;282(4):L833-9.
  22. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*. [Review]. 2008 Nov-Dec;1(4-5):213-20.
  23. Shapiro S. Animal Models of Asthma Pro: Allergic Avoidance of Animal (Model) is not an Option. *Am J Crit Care*. [Editorial]. 2006;174:1171-8.
  24. Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irvin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1992 Jun;89(6):1127-38.
  25. Hahn C, Erb KJ. The preclinical testing strategy for the development of novel chemical entities for the treatment of asthma. *Curr Drug Targets*. [Review]. 2008 Jun;9(6):443-51.
  26. 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 Nov 7;83(2):209-15.
  27. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Feb 1;169(3):378-85.
-

- 
28. Fattouh R, Al-Garawi A, Fattouh M, Arias K, Walker TD, Goncharova S, et al. Eosinophils are dispensable for allergic remodeling and immunity in a model of house dust mite-induced airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jan 15;183(2):179-88.
  29. 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*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Nov 15;173(10):6384-92.
  30. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1999 Dec 15;163(12):6448-54.
  31. Clausen SK, Bergqvist M, Poulsen LK, Poulsen OM, Nielsen GD. Development of sensitisation or tolerance following repeated OVA inhalation in BALB/cJ mice. Dose-dependency and modulation by the Al(OH)<sub>3</sub> adjuvant. *Toxicology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Feb 14;184(1):51-68.
  32. Van Hove CL, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 May;36(5):573-84.
  33. Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AM, Rodriguez D, et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):283-90.
  34. Holt PG, Reid M, Britten D, Sedgwick J, Bazin H. Suppression of IgE responses by passive antigen inhalation: dissociation of local (mucosal) and systemic immunity. *Cell Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1987 Feb;104(2):434-9.
-

---

**CAPÍTULO II**  
**ARTIGO DE REVISÃO**

---



**Título:** Aumento de mortalidade com o uso do fenoterol em asma: evidência histórica suficiente para discutir sua prescrição no Brasil?

**Título abreviado:** Risco de vida com uso de fenoterol em asma.

**Autores:** Andrea Mendonça Rodrigues, Emerson Rodrigues da Silva, Paulo Márcio Pitrez.

**Endereços eletrônicos:**

Andrea M. Rodrigues: [andrea\\_lindenberg@hotmail.com](mailto:andrea_lindenberg@hotmail.com)

Emerson R. da Silva: [dr.emerson@terra.com.br](mailto:dr.emerson@terra.com.br)

Paulo M. Pitrez: [pmpitrez@pucrs.br](mailto:pmpitrez@pucrs.br)

**Currículo Lattes:** todos os autores apresentam currículo Lattes atualizado.

**Contribuição específica dos autores:** todos os autores participaram da revisão da literatura, leitura e análise dos artigos, redação e aprovação final do manuscrito.

**Conflito de interesses:** Paulo M. Pitrez realizou ciclo de palestras no Rio Grande do Sul, em 2010, para a GlaxoSmithKline do Brasil (GSK), no programa de inverno “Respirar”. Os demais autores não apresentam nenhum conflito de interesse.

**Instituição:** Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)/Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS; Curso de Medicina da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

**Autor responsável para correspondência e contato pré-publicação:**

Paulo Márcio Pitrez

Fone: 51 3320 3353/51 9678 1766

Email: [pmpitrez@pucrs.br](mailto:pmpitrez@pucrs.br)

**Contagem total das palavras do texto (excluindo resumo, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras):** 3.696 palavras

**Contagem total das palavras do resumo:** 173 palavras

**Número de tabelas e figuras:** 0

**Observação:** artigo submetido para o Jornal Brasileiro de Pneumologia

---

**RESUMO**

O objetivo do presente artigo é analisar e discutir os estudos e publicações referentes à associação de aumento de mortalidade com o uso de fenoterol no tratamento de asma, seus efeitos colaterais e a situação atual de sua utilização em asma no mundo no Brasil, abrindo um espaço para discussão sobre esta relevante questão clínica. Como fonte de dados inicial, foi utilizada a base de dados do PubMed, utilizando os descritores *asthma AND fenoterol*, e Scielo, utilizando os descritores asma e fenoterol, sendo selecionados os artigos relevantes ao tema. Apresentamos resultados de estudos epidemiológicos realizados em alguns países desenvolvidos e discutimos potencial risco aumentado de mortalidade em pacientes que utilizam fenoterol como medicação de resgate. Vários estudos demonstram também a menor seletividade deste fármaco aos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. A comercialização de fenoterol foi proibida ou restrita em inúmeros países desenvolvidos, mas é amplamente utilizada ainda no Brasil. Os autores concluem que, com as evidências vigentes, a utilização irrestrita deste fármaco em asma deveria ser discutida por especialistas, sociedades médicas e órgãos governamentais no Brasil.

**Palavras-chaves:** mortalidade, asma grave, tratamento, fármacos, simpaticomiméticos.

---

**ABSTRACT**

The aim of the present article is to analyze and discuss the papers published regarding to the association between the increase in asthma mortality and the use of fenoterol in the treatment of asthma, its adverse effects and the current situation of its use in asthma in developed countries and in Brazil, opening the field for discussion of this significant clinical issue. As initial source of data, PubMed and Scielo databases were used, searching through asthma and fenoterol keywords, when relevant articles were selected. We have presented the results from epidemiological studies from developed countries published and the potential increased risk for asthma death in patients who were using fenoterol in asthma as rescue medication. Many studies have also demonstrated that fenoterol is less selective to  $\beta_2$ -agonist receptors. fenoterol use was restricted or prohibited in many developed countries, but is still widely used in Brazil. The authors conclude that, given the current evidences, the restricted use of fenoterol in asthma should be discussed by specialists, medical societies and government agencies in Brazil.

**Keywords:** mortality, severe asthma, treatment, drugs, sympathomimetics

---

---

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, na maioria das vezes iniciada na infância, caracterizada por sintomas respiratórios recorrentes, de característica usualmente reversível. Resultante de uma complexa interação genético-ambiental, estima-se que 300 milhões de pessoas sejam portadoras de asma no mundo, resultando em elevada morbidade e mortalidade em muitos países.<sup>1</sup>

No Brasil, a asma é uma doença prevalente e de alta morbi-mortalidade, resultando em importante comprometimento da qualidade de vida dos pacientes e familiares e elevados custos no tratamento. Resultados de estudos epidemiológicos no Brasil têm demonstrado que a prevalência de asma é elevada, encontrando-se ao redor de 10%.<sup>2,3</sup> Os custos com asma pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são muito elevados, com quase 200.000 hospitalizações em 2010, resultando em um custo de pelo menos 100 milhões de reais neste ano. Além disso, apesar de haver uma idéia genérica de que atualmente as pessoas não morrem mais por asma, no Brasil, a mortalidade estimada em 2000 foi de 2,29/100.000 habitantes e, segundo dados do Ministério da Saúde de novembro de 2010, ocorreram, em 2008, 2.287 óbitos por asma (nos últimos anos, cerca de aproximadamente 6 óbitos/dia).<sup>4</sup>

O tratamento medicamentoso da asma baseia-se em duas linhas principais de abordagem: medicação de controle (antiinflamatórios e broncodilatadores de longa duração) e de resgate (broncodilatadores). O medicamento de resgate mais eficaz e utilizado é o  $\beta_2$ -agonista de curta duração, importante no controle de sintomas resultantes da broncoconstrição transitória e do alívio da obstrução brônquica em episódios de exacerbação aguda da asma, esta última podendo algumas vezes resultar em quadros de asma aguda grave ou fatal.<sup>5</sup> No entanto, evidências de efeitos deletérios do uso de simpaticomiméticos em asma aguda datam da década de 60.<sup>6</sup>

Dois medicamentos de resgate historicamente muito estudados são o salbutamol e o fenoterol. No Brasil, ambos os fármacos são muito prescritos em postos de saúde, consultórios, emergências, hospitais, sendo amplamente utilizados pelo pacientes em

---

---

seus domicílios. No entanto, há algumas décadas, vários estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram uma associação do fenoterol com aumento de mortalidade em asma e um efeito menos  $\beta$ 2-seletivo.<sup>7-12</sup> Ao contrário do Brasil, vários países desenvolvidos restringiram seu uso, retiraram do mercado ou não autorizaram sua comercialização em função destas evidências.<sup>13</sup>

O presente artigo tem como objetivo apresentar e discutir, de forma crítica e atualizada, artigos publicados sobre este tema e orientações de diretrizes sobre manejo de asma internacionais, demonstrando a importância da cautela em relação ao uso de fenoterol no manejo da asma, principalmente no cenário de uso domiciliar, onde suas desvantagens poderiam potencialmente apresentar maior repercussão.

### **Epidemias de mortalidade por asma e sua relação com uso do fenoterol**

Historicamente, há mais de 60 anos, o uso de adrenalina no tratamento de asma resultou em preocupações quanto a sua efetividade e segurança (tolerância, efeito pró-inflamatório e aumento de mortalidade).<sup>14</sup> Na década de 60, uma primeira epidemia de mortalidade de pacientes com asma foi observada, particularmente em alguns países ocidentais (Reino Unido, Nova Zelândia, Austrália e Noruega). Neste período, este aumento de mortalidade foi relacionado ao uso de isoproterenol ( $\beta$ -agonista não seletivo) em uma apresentação comercial inalatória com dose elevada. Apesar de não conclusiva e questionada por alguns pesquisadores, esta hipótese foi reforçada, em parte, porque não foram encontrados dados semelhantes em países no qual a formulação apresentava-se cinco vezes mais baixa (Alemanha e Estados Unidos) ou naqueles no qual as vendas eram reduzidas (Bélgica e Holanda).<sup>15</sup>

Em 1982, uma comunicação breve foi publicada no *British Medical Journal* demonstrando um aumento na mortalidade de asma na Nova Zelândia na década de 70 (33/100.000 pessoas com idade entre 5-34 anos), permanecendo elevada quando comparada a populações da Inglaterra, Austrália, Alemanha Ocidental, Canadá e Estados

---

---

Unidos. Apesar de terem sido aventadas várias hipóteses para esse aumento, como, por exemplo, uma mudança na classificação da doença (1979-80), nenhuma causa específica foi determinada, iniciando-se então estudos sobre esta questão.<sup>16</sup>

Em abril de 1976, o fenoterol foi introduzido na Nova Zelândia, mesmo ano em que teve início o aumento da mortalidade de asma. Em 1983, esta medicação representava quase 30% do total de  $\beta$ 2-agonistas de curta duração comercializados neste país, enquanto representava apenas 5% do mercado em outros países, nem tendo sido introduzido nos Estados Unidos.<sup>13,14</sup> Tal fato, associado juntamente à elevada dose do fenoterol na apresentação comercial (200  $\mu$ g/jato) e a menor seletividade da mesma aos receptores  $\beta$ 2 em relação a outros fármacos de sua classe, resultou em uma seqüência de publicações demonstrando uma associação de automedicação sem supervisão médica com fenoterol inalado com risco aumentado de morte por asma.

No Lancet, em 1989, um primeiro estudo de caso-controle foi publicado envolvendo 117 pacientes que morreram por asma, com idade entre 5-45 anos, no período entre agosto de 1981 e julho de 1983 na Nova Zelândia.<sup>9</sup> Este estudo encontrou um risco relativo para o fenoterol de 1,55 (95% CI: 1,04-2,33; p=0,03), sem que qualquer outro tratamento utilizado ou gravidade da doença (uso de três ou mais classes de fármacos, número de admissões hospitalares nos últimos 12 meses e uso de corticóide oral no momento do óbito ou admissão) tenha sido associado ao aumento do risco de mortalidade, quando ajustado estatisticamente. Os achados deste estudo foram consistentes com a hipótese de que o fenoterol inalado aumentava o risco de morte em asma grave. No entanto, alguns possíveis vieses metodológicos importantes deste estudo foram levantados e discutidos, particularmente vieses de informação (diagnóstico e prescrição da medicação) e de confusão (gravidade da doença). Os casos e controles foram selecionados de fontes diferentes, e baseados em dados retrospectivos de registros e prontuários.<sup>17</sup>

Um segundo estudo neozelandês veio reafirmar o que fora publicado anteriormente, desta vez utilizando-se de todos os paciente que morreram por asma, com idade entre 5-45 anos, entre janeiro de 1977 e julho de 1981, que haviam procurado o

---

---

hospital nos últimos 12 meses por asma aguda.<sup>7</sup> Os controles foram pareados de forma mais adequada, com pacientes atendidos por asma no mesmo hospital no ano do óbito (4 controles para cada caso, novamente). As informações de prescrição, tanto dos casos como dos controles, basearam-se em registros de uma hospitalização prévia por asma, no período de 12 meses, antes do evento índice (hospitalização com óbito nos casos ou última hospitalização dos controles). Os achados foram, então, consistentes aos do primeiro estudo, apresentando, contudo, um maior risco naqueles pacientes com idade menor de 20 anos (OR= 4,02; 95% CI 1,57-10,3) do que nos pacientes maiores de 20 anos (OR=1,33; 95% CI 0,64-2,78). Com base nessas evidências, o departamento de saúde da Nova Zelândia suspendeu a comercialização deste fármaco em 1990.<sup>18</sup>

Em resposta às críticas feitas sobre esses estudos por outros autores,<sup>17</sup> foi publicado em 1991, pelo mesmo grupo de pesquisa da Nova Zelândia, outro estudo com novas evidências, utilizando alguns refinamentos do ponto de vista metodológico.<sup>8</sup> Foram estudados 112 casos de óbito por asma, em pacientes entre 5-45 anos, entre agosto de 1982 e dezembro de 1987, desta vez utilizando-se 2 grupos controles: Grupo A (427 pacientes admitidos por asma no mesmo ano em que ocorreu o óbito por asma, além de também terem sido admitidos pela mesma doença nos últimos 12 meses), e Grupo B (448 pacientes admitidos no hospital no mesmo ano em que a admissão do caso ocorreu). A razão de chances de óbito para uso de fenoterol inalado no grupo A foi de 2,11 (95% CI 1,37-3,23 p<0,01) e, no grupo B, de 2,66 (95% CI 1,74-4,06 p<0,01). Esses resultados corroboraram a hipótese já apresentada nos dois estudos anteriores, em que o fenoterol inalado aumentava o risco de mortalidade em pacientes com asma grave.

Em 1992, um dos maiores críticos dos estudos de associação de mortalidade por asma e uso de fenoterol, Walter O. Spitzer, publicou com colaboradores um estudo em uma população canadense<sup>19</sup>, apresentando resultados com conclusões opostas aos dos estudos da Nova Zelândia. Interessante identificar que, mesmo após críticas de Walter Spitzer em cartas ao Editor em anos anteriores,<sup>17</sup> a seleção dos controles foi pobre, incluindo ajuste inadequado também para gravidade da asma. Este estudo canadense abrange uma coorte retrospectiva de uma base de dados de 12.301 pacientes da província de Saskatchewan. As medicações para asma haviam sido prescritas entre 1978

---

---

e 1987, com 129 pacientes com asma fatal ou quase fatal. O uso de  $\beta_2$ -agonistas de curta duração foi associado a óbito por asma (OR:2,6; 95%CI: 1,7-3,9), ou óbito e asma quase-fatal juntos (OR: 1,9; 95%CI: 1,6-2,4). Quando fenoterol e salbutamol foram comparados em relação a microgramas equivalentes, não foi encontrada nenhuma diferença entre fenoterol e salbutamol em relação a óbito por asma. Assim, este estudo concluiu que apesar do uso de  $\beta_2$ -agonista de curta duração ter sido associado à asma fatal ou quase fatal, não foi encontrada nenhuma associação com fenoterol ou outra medicação específica. Além disto, Garret et al. demonstraram em outra coorte retrospectiva na Nova Zelândia que, apesar de pacientes com asma mais grave utilizarem mais fenoterol no estudo, seu uso não está associado a episódios de asma com risco de vida.<sup>20</sup>

Em 1980, a mortalidade por asma dobrou no Japão, corroborando os fatos ocorridos na Nova Zelândia, resultando na criação do Comitê de Mortalidade de Asma da Sociedade Japonesa de Alergia Pediátrica e Imunologia Clínica, que reportou a relação entre a dependência do uso de  $\beta_2$ -agonistas de curta duração e aumento da taxa de mortalidade em asmáticos, principalmente entre os meninos e maiores de 13 anos. Entre as mortes, o fenoterol foi utilizado em mais da metade dos casos, ao mesmo tempo em que sua venda representava apenas 18,3% do mercado. Importante lembrar que neste estudo não houve um grupo controle ou dados sobre o uso do fenoterol em diferentes faixas etárias ou graus de severidade da asma. Porém, considerando análises realizadas e tendo em vista os outros estudos epidemiológicos já realizados, as evidências resultaram em suspeita suficiente do risco do fenoterol em asma, fazendo com que o Ministério Japonês da Saúde e Previdência Social alertasse que o uso desta medicação por via inalatória devesse ser evitado em crianças. Assim, neste período, o Japão foi o quarto país a adotar restrições ou recomendações ao uso de fenoterol, seguindo os Estados Unidos (onde a medicação nem foi licenciada), Nova Zelândia (onde foram retirados os subsídios do governo) e Austrália (recomendação que a droga não deve ser usada em asmáticos graves). Outros países não tomaram a mesma decisão, talvez pelo fato da empresa fabricante ter reduzido a dose de fenoterol para 100  $\mu\text{g}$ /jato, na maioria dos locais onde é comercializado.<sup>21</sup> Além disso, em 1998, houve um aumento da mortalidade

---



---

entre os japoneses entre 10-14 anos, concomitante com o aumento das vendas de isoprenalina, que assim como o fenoterol, é outro medicamento  $\beta$ 2-agonista de curta duração, porém não-seletivo em doses usuais. Após a queda de vendas do fármaco houve redução da mortalidade no Japão, de acordo com o Ministério Japonês de Previdência Social.

Com todas estas evidências, a partir da metade da década de 90, alguns artigos de revisão sobre o tema começaram a ser publicados e o assunto mais profundamente refletido e discutido. Pearce et al.<sup>18</sup> atribuíram o aumento da mortalidade por asma na Nova Zelândia ao uso do fenoterol, baseando-se no fato de que as mortes iniciaram com a introdução do fármaco no mercado. Além disso, aquele país apresentava a maior venda de fenoterol por habitantes no mundo, e continha alta dosagem na formulação (200  $\mu$ g/dose).

No final da década de 90, um artigo de revisão de Beasley et al.,<sup>14</sup> apresentou uma revisão sobre o ocorrido desde a primeira onda de mortalidade em asma, afirmando que o uso de fenoterol não teria aumentado caso não houvesse resposta com a dose usual. Até a segunda onda de mortalidade, com o início das publicações do grupo da Nova Zelândia e da indústria fabricante do fenoterol, uma extensa discussão com várias controvérsias foi iniciada, até que, naquele país, em 1989, a Ministra da Saúde, Helen Clark, anunciou o fim do subsídio para o fenoterol, seguido por práticas semelhantes na Austrália, ocasião em que houve redução da dose da apresentação comercial pela Boehringer Ingelheim.

Mais recentemente, em 2009, para tentar sanear melhor as dúvidas vigentes sobre esta questão, Pearce<sup>13</sup> publicou um dos últimos artigos de revisão abordando este tema, efetuando um novo olhar sobre a análise da metodologia e resultados do estudo de Saskatchewan<sup>19</sup>, no Canadá, utilizando-se da metodologia dos estudos neozelandeses, onde encontrou um risco relativo de 8,1 no grupo que utilizava somente o fenoterol, em relação a um risco relativo de 3,7 encontrado na análise original do estudo. Outro problema importante deste estudo, levantado por Pearce, foi que o diagnóstico de asma não foi confirmado no grupo controle, que poderia explicar porque estes utilizavam

---

menos  $\beta$ 2-agonistas de curta duração que os casos. Este achado foi importante para a análise, visto que, ao comparar o grupo que utilizava somente fenoterol com o grupo que utilizava somente salbutamol, a taxa de mortalidade era 3,7 vezes maior. Refazendo a regressão logística, o risco relativo de fenoterol aumenta de 5,3 para 9,1 e o do salbutamol de 0,9 para 2,8, quando ambas variáveis eram colocadas no modelo estatístico simultaneamente. Pearce concluiu então que o estudo de Saskatchewan: 1) demonstra que o fenoterol, comparado a outros fármacos, apresenta um risco mais alto de mortalidade por asma; 2) mostra que os resultados apresentados no artigo são falhos porque a seleção dos controles inclui pacientes não asmáticos e a análise da quantidade de  $\beta$ 2-agonistas utilizada é confundida pela gravidade da doença; e por fim, 3) apresenta um importante conflito de interesse, quando Walter O. Spitzer, autor e mentor do estudo, é consultor da empresa que comercializa o fenoterol (Boehringer Ingelheim), tendo defendido a controvérsia desta causa ao longo dos anos.

Em relação ao Brasil, o sistema de organização de estatísticas em saúde evoluiu de certa forma nas últimas décadas, mas infelizmente está distante de oferecer dados fiéis e detalhados de mortalidade da doença na linha do tempo, particularmente na qualidade de registro médico da causa de óbito em todo o território nacional. Este fato dificulta muito a análise de mortalidade de asma, em um nível sensível para acompanhar o perfil de comportamento de uma doença. Desta forma, a realização de estudos detalhados da relação do fenoterol com mortalidade de asma no Brasil encontra um cenário não muito favorável, como aconteceu anteriormente em outros países, tanto pela falta de registros fidedignos de mortalidade de asma e prescrição de medicamentos, quanto pelo número de evidências prévias de seu risco e restrição ou proibição de uso em outros países.

---

**Efeitos colaterais do fenoterol**

Em paralelo aos dados de associação de mortalidade de asma com o uso do fenoterol, começou a ser discutida também a potencial maior toxicidade e menor segurança do fenoterol em relação a outros  $\beta$ 2-agonistas de curta duração.<sup>14</sup>

Tandon,<sup>10</sup> no início da década de 80, primeiramente demonstrou que pacientes adultos com asma estável, usando doses repetidas de fenoterol, apresentavam maior variação no aumento da frequência cardíaca, quando comparado ao salbutamol ( $p < 0,01$ ), e arritmia ventricular foi evidenciada em 3 pacientes que utilizaram somente fenoterol. Outro estudo demonstrou que não houve diferença no efeito broncodilatador entre fenoterol, isoproterenol ou albuterol, mas o fenoterol e o isoproterenol apresentaram maior efeito inotrópico positivo e o fenoterol apresentou maior queda nos níveis de potássio sérico.<sup>22</sup> Em outro estudo transversal, duplo-cego, controlado por placebo, comparando a resposta de adultos com história de asma a fenoterol, salbutamol e terbutalina, com diferentes doses das respectivas medicações (2, 6 e 18 jatos), em um intervalo de 90 minutos, demonstrou efeito broncodilatador semelhante das medicações, mas também o fenoterol apresentou um maior aumento da frequência cardíaca ( $p < 0,01$ ), do intervalo QT no eletrocardiograma ( $p < 0,01$ ) e de tremores ( $p < 0,01$ ), além de redução dos níveis de potássio sérico ( $p < 0,01$ ), em relação aos outros fármacos.<sup>11</sup>

Lipworth et al.<sup>23</sup> compararam as potências de salbutamol e fenoterol nas vias aéreas, bem como seus efeitos sistêmicos, em pacientes de 40 anos com doses equivalentes. Não houve diferença também entre o efeito broncodilatador dos dois fármacos, mas o fenoterol mostrou-se menos seletivo que o salbutamol, particularmente em relação aos níveis de potássio, tremores e frequência cardíaca, à exceção da dose convencional de 200  $\mu$ g, onde a única diferença apresentada foi em relação a tremores. Por fim, Newhouse et al.<sup>24</sup> publicaram um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, envolvendo 128 pacientes utilizando fenoterol e 129 utilizando albuterol, todos com asma aguda grave. O fenoterol obteve uma maior queda nos níveis séricos de potássio, além de aumento no intervalo QT ( $p < 0,05$ ), particularmente em pacientes que

---

não receberam oxigênio suplementar. Não houve no entanto diferenças de eventos sérios de arritmia ou óbitos, devendo ser considerada que a amostra do estudo não é muito robusta. Bremner et al.<sup>25</sup> compararam os máximos efeitos extrapulmonares entre salbutamol e fenoterol, em 8 voluntários saudáveis, de 22 a 45 anos, onde 400 µg de cada fármaco eram administrados a cada 10 minutos, até que houvesse um platô pré-estabelecido nos níveis de potássio e QS<sub>2</sub>I (uma medida de inotropismo cardíaco). Foi encontrado uma maior resposta máxima (Emax) do fenoterol em relação ao salbutamol na redução do potássio sérico e cAMP (marcador de ativação de receptor β). Este níveis foram alcançados utilizando-se uma média de 6 jatos de fenoterol e 11 de salbutamol, sugerindo que a utilização de jatos equivalentes, independentemente da dosagem em microgramas, de ambos os fármacos, no manejo da asma aguda grave, poderia contribuir para o aumento da mortalidade. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que os efeitos cronotrópico e eletrofisiológico do fenoterol são significativamente aumentados em presença de hipoxemia.<sup>26</sup>

Por fim, o uso regular de β<sub>2</sub>-agonistas tem sido relacionado também à piora do controle da asma, provavelmente através de efeitos sobre hiperresponsividade brônquica, desenvolvimento de tolerância ao fármaco, redução da proteção do estímulo provocador da exacerbação ou ainda mascarando os sintomas de piora do quadro de asma aguda.<sup>14</sup> No entanto, os estudos epidemiológicos mostrando a relação entre mortalidade por asma e uso do fenoterol não foram delineados para estudar mecanismos causais. São fortes as evidências de uma associação entre o uso do fenoterol com aumento no número de mortes em asma, mas os mecanismos responsáveis por esta relação não são claros. O conjunto de evidências consistentes que demonstram uma menor especificidade do fenoterol aos receptores β-adrenérgicos sugere que este pode ser um dos fatores relevantes responsáveis pelas epidemias de mortalidade na asma, associados particularmente a automedicação de pacientes com esta doença. Por outro lado, a hipótese de mascaramento de um quadro de asma grave com o uso de fenoterol, com seu potente efeito β<sub>2</sub>-agonista não pode ser descartado. Ainda assim, ambos os fatores (toxicidade e atraso no diagnóstico) podem estar conjuntamente envolvidos nas epidemias de mortalidade relatadas na literatura.

---

---

### **Situação do fenoterol em alguns países e no Brasil**

Com todas essas evidências publicadas na literatura, o fenoterol teve seu subsídio retirado para comercialização na Austrália e Nova Zelândia, sofreu restrições e recomendações ao seu uso no Japão, e nunca foi licenciado para uso nos Estados Unidos. No Reino Unido, a empresa responsável por sua comercialização não apresenta o fenoterol como alternativa de venda no seu portfólio.

No Brasil, o fenoterol é comercializado desde 1977,<sup>27</sup> nunca teve seu uso restrito ou reorientado em normas ou diretrizes nacionais, mesmo após a ampla discussão mundial. No Brasil, dados sobre a comercialização de fármacos infelizmente não são de domínio público. No entanto, na experiência pessoal dos autores, obviamente sujeita a direitos de resposta, a prescrição de fenoterol em asma, pelo menos na faixa etária pediátrica (área de atuação dos autores), é bastante alta. Esta observação prática, se correta, demonstra que, mesmo com todas as advertências encontradas nos trabalhos científicos publicados até o presente e restrições ou proibição de uso em muitos países desenvolvidos, o fenoterol ainda continua sendo muito popular e utilizado no Brasil.

Uma análise das diretrizes de manejo de asma internacionais e brasileiras reforçam esta preocupação dos autores em relação ao uso “indiscriminado” do fenoterol no Brasil. As diretrizes do *Global Initiative for Asthma* (GINA)<sup>5</sup> de 2009 e da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia<sup>28</sup> de 2006 não mencionam, em nenhum momento, as evidências de associação do fenoterol com risco de asma fatal e nenhuma orientação de restrição ao uso do fenoterol. No caminho contrário, o *British Guideline on the Management of Asthma*<sup>29</sup> apresenta o salbutamol como única alternativa de uso de  $\beta$ 2-agonistas de curta duração em asma. Além disso, e de forma explícita e determinada, as diretrizes americanas do *National Asthma Education and Prevention Program, do National Heart, Blood and Lung Institute*<sup>30</sup> - comentam que “... no passado, dois  $\beta$ 2-agonistas de curta duração (isoprenalina e fenoterol), que eram menos seletivos ou eram usados em doses mais altas, foram associados à asma grave e fatal.

---

*Além disso, o uso regular do fenoterol resultou em significativa redução no controle da asma e em medidas objetivas de função pulmonar ...”.*

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Concluindo, as evidências apresentadas e discutidas convidam especialistas e representantes de sociedades médicas no Brasil a discutir esta questão de forma detalhada e isenta. Em virtude do cenário apresentado sobre o uso de fenoterol no manejo de asma no Brasil, a utilização ampla e irrestrita deste fármaco deve ser revisado e discutido no país. Sociedades médicas, órgão governamentais, especialistas, pesquisadores e autoridades no assunto, devem se reunir para esclarecer a importância desta questão em caráter nacional.

Na opinião dos autores, existem evidências suficientes para utilizar com parcimônia ou restringir de forma significativa a prescrição de fenoterol em asma aguda no Brasil, tanto em adultos quanto em crianças. Se não houvesse nenhuma outra alternativa farmacológica broncodilatadora no manejo da asma, obviamente o fenoterol seria utilizado sem maiores restrições, uma vez que medicações de resgate são essenciais no tratamento da asma. No entanto, felizmente, este não é o caso. Existem alternativas mais seguras e com menos efeitos adversos. Muitos países desenvolvidos decidiram por seguir esse caminho. Agir de forma contrária fere o bom senso clínico e científico, que deveria nortear condutas médicas e diretrizes no país. Os autores esperam que este artigo de revisão resulte em uma discussão nacional envolvendo a comunidade científica sobre este tema, com o objetivo de beneficiar muitos dos pacientes com asma que tratamos rotineiramente, particularmente aqueles que muitas vezes fazem uso de broncodilatadores de forma autônoma e domiciliar, sem supervisão direta de profissionais da área da saúde, distribuídos no imenso território brasileiro.

---

---

**REFERÊNCIAS**

1. Braman SS. The global burden of asthma. *Chest* 2006;130:4S-12S.
  2. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351:1225-32.
  3. Pereira MU, Sly PD, Pitrez PM, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J* 2007;29:1154-60.
  4. DATASUS - Ministério da Saúde do Brasil,. (Accessed 24/11, 2011, at <http://tabnet.datasus.gov.br>.)
  5. Global strategy for asthma management and prevention. 2009. (Accessed January, 2011, at <http://www.ginasthma.org>.)
  6. Crane J, Pearce N, Burgess C, Beasley R. Asthma and the beta agonist debate. *Thorax* 1995;50 Suppl 1:S5-10.
  7. Pearce N, Grainger J, Atkinson M, et al. Case-control study of prescribed fenoterol and death from asthma in New Zealand, 1977-81. *Thorax* 1990;45:170-5.
  8. Grainger J, Woodman K, Pearce N, et al. Prescribed fenoterol and death from asthma in New Zealand, 1981-7: a further case-control study. *Thorax* 1991;46:105-11.
  9. Crane J, Pearce N, Flatt A, et al. Prescribed fenoterol and death from asthma in New Zealand, 1981-83: case-control study. *Lancet* 1989;1:917-22.
  10. Tandon MK. Cardiopulmonary effects of fenoterol and salbutamol aerosols. *Chest* 1980;77:429-31.
  11. Wong CS, Pavord ID, Williams J, Britton JR, Tattersfield AE. Bronchodilator, cardiovascular, and hypokalaemic effects of fenoterol, salbutamol, and terbutaline in asthma. *Lancet* 1990;336:1396-9.
  12. Bremner P, Burgess C, Beasley R, et al. Nebulized fenoterol causes greater cardiovascular and hypokalaemic effects than equivalent bronchodilator doses of salbutamol in asthmatics. *Respir Med* 1992;86:419-23.
  13. Pearce N. The use of beta agonists and the risk of death and near death from asthma. *J Clin Epidemiol* 2009;62:582-7.
  14. Beasley R, Pearce N, Crane J, Burgess C. Beta-agonists: what is the evidence that their use increases the risk of asthma morbidity and mortality? *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:S18-30.
  15. Jalba MS. Three generations of ongoing controversies concerning the use of short acting beta-agonist therapy in asthma: a review. *J Asthma* 2008;45:9-18.
  16. Jackson RT, Beaglehole R, Rea HH, Sutherland DC. Mortality from asthma: a new epidemic in New Zealand. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982;285:771-4.
  17. Spitzer WO, Buist AS. Case-control study of prescribed fenoterol and death from asthma in New Zealand, 1977-81. *Thorax* 1990;45:645-6.
-

- 
18. Pearce N, Beasley R, Crane J, Burgess C, Jackson R. End of the New Zealand asthma mortality epidemic. *Lancet* 1995;345:41-4.
  19. Spitzer WO, Suissa S, Ernst P, et al. The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma. *N Engl J Med* 1992;326:501-6.
  20. Garrett JE, Lanes SF, Kolbe J, Rea HH. Risk of severe life threatening asthma and beta agonist type: an example of confounding by severity. *Thorax* 1996;51:1093-9.
  21. Beasley R, Nishima S, Pearce N, Crane J. Beta-agonist therapy and asthma mortality in Japan. *Lancet* 1998;351:1406-7.
  22. Windom HH, Burgess CD, Siebers RW, et al. The pulmonary and extrapulmonary effects of inhaled beta-agonists in patients with asthma. *Clin Pharmacol Ther* 1990;48:296-301.
  23. Lipworth BJ, Newnham DM, Clark RA, Dhillon DP, Winter JH, McDevitt DG. Comparison of the relative airways and systemic potencies of inhaled fenoterol and salbutamol in asthmatic patients. *Thorax* 1995;50:54-61.
  24. Newhouse MT, Chapman KR, McCallum AL, et al. Cardiovascular safety of high doses of inhaled fenoterol and albuterol in acute severe asthma. *Chest* 1996;110:595-603.
  25. Bremner P, Siebers R, Crane J, Beasley R, Burgess C. Partial vs full beta-receptor agonism. A clinical study of inhaled albuterol and fenoterol. *Chest* 1996;109:957-62.
  26. Bremner P, Burgess CD, Crane J, et al. Cardiovascular effects of fenoterol under conditions of hypoxaemia. *Thorax* 1992;47:814-7.
  27. Boehringer Ingelheim do Brasil. Nosso Negócio - Cronologia da Boehringer Ingelheim do Brasil. 2011. (Accessed at <http://www.boehringer-ingelheim.com.br>.)
  28. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. 1996. (Accessed 7, 32, at
  29. British Thoracic Society - Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British Guideline on the Management of Asthma - A national clinical guideline. May 2008 - revised June 2009. (Accessed at [www.sign.ac.uk/guidelines/published/numlist.html](http://www.sign.ac.uk/guidelines/published/numlist.html).)
  30. National Heart Lung and Blood Institute - National Asthma Education and Prevention Program. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. 2007. (Accessed at <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/>.)
-



---

**CAPÍTULO III**  
**ARTIGO ORIGINAL**

---

---

## Artigo original

**Título:** Nova proposta de modelo murino de asma aguda: utilização de protocolo curto sem adjuvante com sensibilização a ovalbumina.

**Submissão:** Este manuscrito será submetido para o Jornal Brasileiro de Pneumologia.

**Título abreviado:** Nova proposta de modelo murino de asma aguda

**Autores:** Andrea Mendonça Rodrigues, Camila Parreira, Diego Uchoa, Lucien Gualdi, Raquel Cao, Rodrigo Godinho de Souza, Ana Claudia Pereira, Nailê Nuñez, Alisson Schleich, Marcus Herbert Jones, Renato Tetelbom Stein, Paulo Márcio Pitrez.

**Endereços eletrônicos:**

Andrea M. Rodrigues: [andrea\\_lindenberg@hotmail.com](mailto:andrea_lindenberg@hotmail.com)

Paulo M. Pitrez: [pmpitrez@pucrs.br](mailto:pmpitrez@pucrs.br)

**Currículo Lattes:** Todos os autores apresentam currículo Lattes atualizado.

**Contribuição específica dos autores:** Todos os autores participaram da revisão da literatura, leitura e análise dos artigos, redação e aprovação final do manuscrito.

**Conflito de interesses:** Não há conflitos de interesse.

**Instituição:** Faculdade de Medicina da PUCRS/Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

**Autor responsável para correspondência e contato pré-publicação:**

Paulo Márcio Pitrez

Fone: 51 3320 3353/51 9678 1766

Email: [pmpitrez@pucrs.br](mailto:pmpitrez@pucrs.br)

**Contagem total das palavras do texto (excluindo resumo, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas e legendas das figuras):** 2865 palavras

**Contagem total das palavras do resumo:** 248 palavras

**Número de tabelas e figuras:** 01 tabela, 04 figuras

**Obs:** Este manuscrito será submetido ao Jornal Brasileiro de Pneumologia

---

---

## INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica das vias aéreas inferiores que acomete cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo, com elevada morbidade e custos para a sociedade, sendo caracterizada por infiltração de células CD4+ T-helper 2 (Th2) e eosinófilos nas vias aéreas, associado à produção de IgE alérgeno-específico.<sup>2</sup>

Para a pesquisa de novas terapias para o tratamento da asma, bem como para melhor entendimento da fisiopatogenia da doença, há quase três décadas modelos animais são utilizados.<sup>4</sup> Deste modo, foram desenvolvidos modelos murinos que envolvem o processo de sensibilização a antígenos de interesse, com posterior “desafio” das vias aéreas, a fim de desencadear uma resposta pulmonar alérgica semelhante à asma.<sup>6</sup> No entanto, tem se discutido amplamente que nenhum animal de laboratório desenvolve características fenotípicas semelhantes à asma em humanos.<sup>7</sup>

Dentre os animais estudados, o camundongo isogênico é o mais popular, devido ao detalhado conhecimento da sua genética e pela clara resposta imune Th2 desenvolvida em seus pulmões, quando expostos a alérgeno específicos.<sup>6</sup> Classicamente, camundongos da linhagem BALB/c são expostos à ovalbumina (OVA) intraperitoneal (IP) para sensibilização, em um intervalo de 14 dias, juntamente com um adjuvante (alum), que apesar do uso rotineiro, é uma forma artificial de potencializar a resposta alérgica pulmonar.<sup>18</sup> Este tem sido o protocolo padrão mais utilizado na literatura como modelo murino de asma. A superação de duas limitações frequentemente descritas (uso de adjuvante e tempo prolongado de protocolo) poderia ser atraente para a realização de

---

modelos murinos de asma mais aprimorados, particularmente em testes pré-clínicos de novos fármacos.

Buscando uma alternativa para não utilizar adjuvante em modelos murinos de asma, Conrad et al. demonstraram recentemente que a sensibilização subcutânea (SC) a OVA, sem utilização de adjuvante, resulta em uma resposta pulmonar alérgica semelhante a protocolos previamente estabelecidos.<sup>1, 24</sup> Os resultados deste estudo permitem excluir o uso de adjuvante em modelos murinos de asma em estudos futuros, que tem resultado em críticas justificadas sobre a forma artificial corrente de estudar asma em modelos animais. No entanto, este estudo utiliza três sensibilizações, com intervalos de 7 dias, mantendo este protocolo ainda muito longo. Com isto, em relação ao tempo de duração dos modelos murinos de asma, protocolos de curta duração, e particularmente associados à ausência de adjuvante, não foram testados até o presente. A viabilidade de um modelo deste tipo seria uma forma interessante de estudar preliminarmente novas terapias em asma, particularmente relacionadas à resposta pulmonar eosinofílica. Principalmente no cenário da indústria farmacêutica, protocolos mais longos tem sido uma limitação para estudar novos fármacos.<sup>25</sup>

Desta forma, o objetivo do presente estudo é buscar alternativas de protocolos com modelos animais de asma com características menos artificiais e com duração mais curta. Foi comparado um protocolo de duração de 10 dias, utilizando somente uma sensibilização subcutânea com OVA, sem uso de adjuvante, com outros protocolos padrões já publicados em estudos prévios.

---

## MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 44 camundongos isogênicos, da linhagem BALB/c, fêmeas adultas (entre 6 e 8 semanas de vida), provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul. Os animais foram alimentados, antes e durante a fase de experimentação, com ração balanceada para roedores e água ad libitum. Criados em biotério convencional, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da PUCRS (IPB-PUCRS), foram mantidos em gaiolas, devidamente identificadas, sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (6:00/18:00). Os animais foram divididos em 5 grupos de 7 animais cada, onde foram testados diferentes modelos de indução de resposta pulmonar alérgica. Os grupos foram classificados de acordo com a forma de sensibilização (IP/SC, e com ou sem adjuvante), número de sensibilizações (uma ou duas vezes), número de desafios intranasais (dois ou três) e dose de OVA no desafio intranasal (40 µg ou 100 µg). Como grupos controles, foi utilizado um grupo controle positivo, com duração de 28 dias, amplamente utilizado, com OVA IP e adjuvante, e um grupo controle negativo, sem nenhuma intervenção.

### Protocolo de resposta pulmonar alérgica com uso de ovalbumina

A sensibilização e desafio intranasal com OVA foram realizados com volumes de 200 µL e 50 µL, respectivamente, diluídos em DPBS. A dose utilizada para sensibilização com OVA foi de 20 µg em todos os grupos, exceto o controle negativo.

---

---

Na realização do desafio intranasal com OVA, para permitir a aspiração pulmonar, os animais foram anestesiados em uma câmara anestésica, utilizando-se isofluorano.

Os animais do grupo 1 (OVA SC, IN 100, 2X – 21 dias) foram sensibilizados com OVA SC nos dias 0 e 7. O desafio intranasal foi realizado com solução de OVA (100 µg), por 2 dias consecutivos (dias 19 e 20). A única diferença entre o grupo 1 e 4 foram os números de desafios intranasais, este último realizado nos dias 18, 19 e 20. O grupo 2 (OVA SC, IN 40, 3X – 21 dias) teve como diferença o desafio intranasal com solução de OVA 40 µg por animal, realizada por 3 dias (dias 18, 19 e 20), sendo o mesmo método e dosagem utilizada pelo grupo 3 (OVA SC, IN 40 2X – 21 dias), porém com diferença no número de desafios, que foram feitos nos dias 19 e 20. No grupo 5, foco principal deste estudo, foi realizado apenas uma sensibilização com OVA, sendo utilizado 100 µg de OVA IN por 3 dias consecutivos nos dias 7, 8 e 9. Os grupos 6 e 7, foram o controle negativo e positivo, respectivamente. O grupo 6 (Controle negativo) utilizou apenas DBPS na sensibilização nos dias 0 e 14 e no desafio intranasal nos dias 25, 26 e 27. O grupo 7 (controle positivo), realizou OVA com alum (1 mg) SC por animal, nos dias 0 e 14, seguindo-se da administração de 100 µg de OVA IN por animal, nos dias 25, 26 e 27. Os grupos e protocolos são apresentados na Tabela 1 e na Figura 3.

---

**Tabela 1. Divisão dos grupos de camundongos estudados de acordo com intervenção e dosagem de ovalbumina para desafio intranasal.**

| <b>Grupos</b>   | <b>Número de animais (n=44)</b> |
|---|---------------------------------|
| 1- OVA SC (2x), IN 100 µg (2x) - 21 dias                | 7                               |
| 2- OVA SC (2x), IN 40 µg (3x) - 21 dias                 | 7                               |
| 3- OVA SC (2x), IN 40 µg (2x) - 21 dias                 | 7                               |
| 4- OVA SC (2x), IN 100 µg (3x) - 21 dias                | 7                               |
| 5- OVA SC (1x), IN 100 µg (3x) - 10 dias (curto)        | 7                               |
| 6- DPBS SC (2x), IN DPBS (3x) - 28 dias (Ctl -)         | 4                               |
| 7- OVA IP (2x) + alum, IN 100 µg (3x) - 28 dias (Ctl +) | 5                               |

- OVA: ovalbumina; SC: subcutânea; IN: intranasal; Ctl: controle.

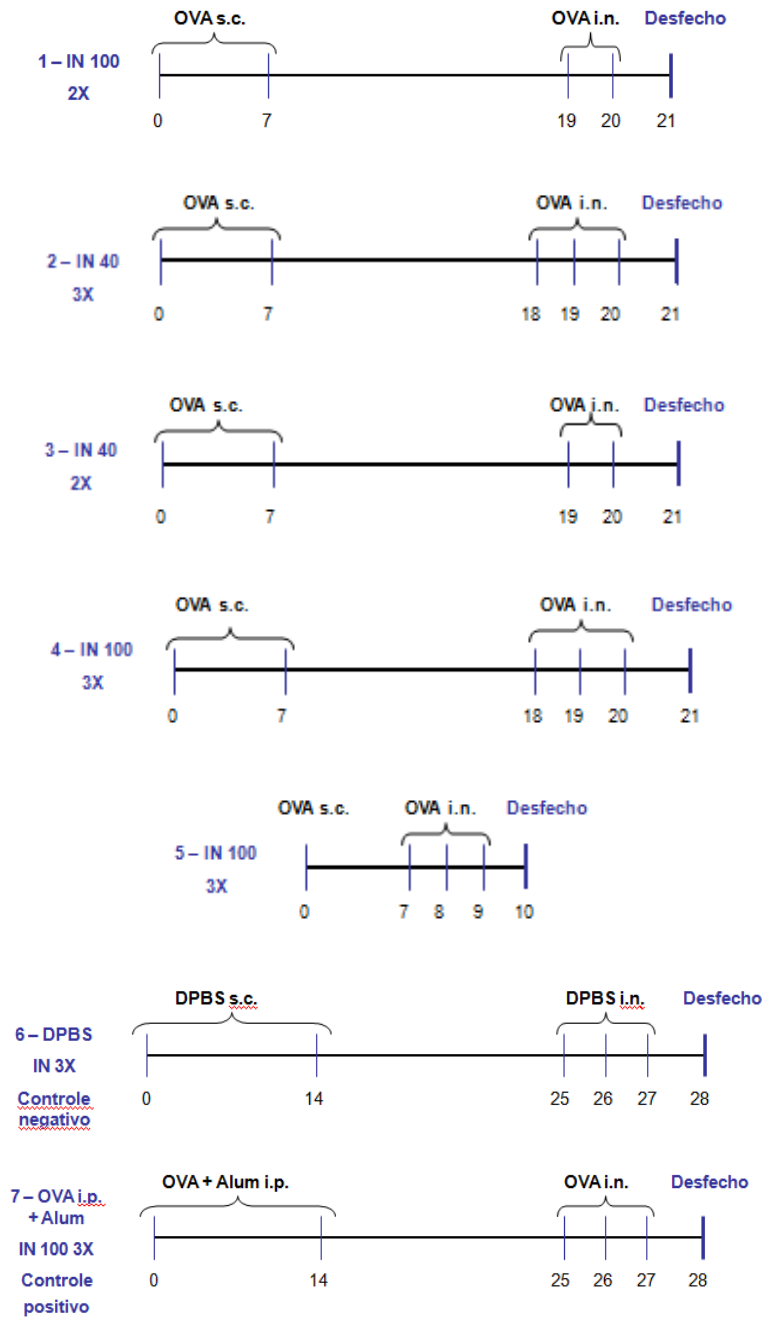


Figura 1. Protocolos utilizados para indução de reposta inflamatória aguda em pulmões de camundongos BALB/c fêmeas. OVA: ovalbumina; s.c.: subcutânea; i.n.: intranasal.



*Lavado broncoalveolar (LBA)*

O LBA foi realizado através da canulação da traquéia com agulha de ponta romba, após anestesia com xilazina (100mg/ml) e cetamina (100mg/ml), proporção de 1:9 na solução (dose: 0,1 ml). Uma solução de DPBS (1 mL) foi por instilada via intratraqueal, e aspirada logo após, por 3 vezes consecutivas. Após o procedimento, os animais foram sacrificados com doses letais dos fármacos utilizados para anestesia (dose: 0,3 ml, IP) e descartados de acordo com as normas da instituição.

Contagem total de células e exame citológico diferencial no LBA

A amostra do LBA foi pesada e centrifugada em centrífuga refrigerada a 4 C° (1500 rpm, por 10 minutos). O precipitado foi ressuspendido 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, Germany). Para a análise da citologia diferencial, a suspensão do precipitado foi colocada em citocentrífuga (30g, 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.

---

---

Ensaio de peroxidase eosinofílica (EPO) de tecido pulmonar

Para avaliar a atividade eosinofílica no tecido pulmonar, após o LBA e ressecção do pulmão, foi realizada uma reação química do sobrenadante resultante da maceração do tecido pulmonar com o substrato cromogênico OPD (fenilenediamina). Este método permite quantificar a reação de enzimas da classe das peroxidases secretadas por eosinófilos, através de uma medida de absorvância óptica. Neste método, conforme demonstrado por Strath e colaboradores,<sup>26</sup> é possível quantificar a atividade eosinofílica através da reação das enzimas (peroxidases), sem interferência de outras peroxidases que possam estar presentes no tecido analisado. Fragmentos do tecido pulmonar foram congelados e descongelados 3 vezes em nitrogênio líquido. Após a centrifugação a 4°C, por 10 minutos, foram realizadas cinco diluições seriadas do sobrenadante em placas de 96 poços (50µl/poço). Em seguida, foi adicionado 100µl de substrato (1,5mM de OPD e 6,6mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluídos em 0,05M de tampão Tris-HCl, pH 8,0). Após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com solução de 1M de ácido sulfúrico e a absorvância das amostras foi determinada à 492nm.

Análise histopatológica

Após remoção dos pulmões, foi realizada perfusão com formalina tamponada a 10%, através de coluna de gravidade (20 mmHg). As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar e corados com hematoxilina-eosina (HE) para

---

análise histopatológica em microscópio óptico. Uma avaliação qualitativa da presença de resposta inflamatória brônquica foi realizada, bem como contagem do número de eosinófilos em um campo, em 3 brônquios diferentes, para classificação de gravidade da inflamação eosinofílica.

#### Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SPSS, versão 17.0. Inicialmente, foi realizada a análise descritiva das variáveis, observando-se que os dados não seguiam um padrão de distribuição normal, sendo então utilizados testes não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi então utilizado, com análise *post-hoc* de Dunn, para aquelas comparações que atingiram significância estatística. O controle negativo foi testado estatisticamente em separado com os grupos estudados, utilizando o teste de Mann-Whitney, com ajuste para múltiplas comparações por Finner. O nível de significância estabelecido foi de 0,05. Como desfecho principal, utilizamos a contagem, atividade e presença de eosinófilos no pulmão dos animais, por ser a célula efetora do sistema imune mais importante neste modelo experimental.

O cálculo do tamanho amostral foi de 7 animais por grupo. Este cálculo foi baseado em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, utilizando como desfecho principal a contagem absoluta de eosinófilos no LBA para uma média de  $0,7 \times 10^6$  cél/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 80%.

---

Aspectos éticos

O estudo foi realizado sob normas éticas para pesquisa em modelos animais, seguindo o preconizado pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), preconizando a utilização do menor número de animais e manejo da dor e sofrimento durante os procedimentos do estudo e eutanásia. Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (CEUA/PUCRS).

---

## RESULTADOS

Nosso estudo comparou modelos indutores de resposta pulmonar alérgica em camundongos, utilizando o modelo tradicional (controle positivo), para comparar com outros grupos que utilizaram OVA SC na sensibilização e diferentes doses/números de aplicações da mesma no desafio intranasal, com redução ou não do tempo de protocolo. Foi avaliado principalmente então se o uso de um grupo com protocolo de duração curta (1 dose de sensibilização e duração de 10 dias) apresenta uma resposta pulmonar alérgica semelhante ao protocolo padrão utilizados na literatura.

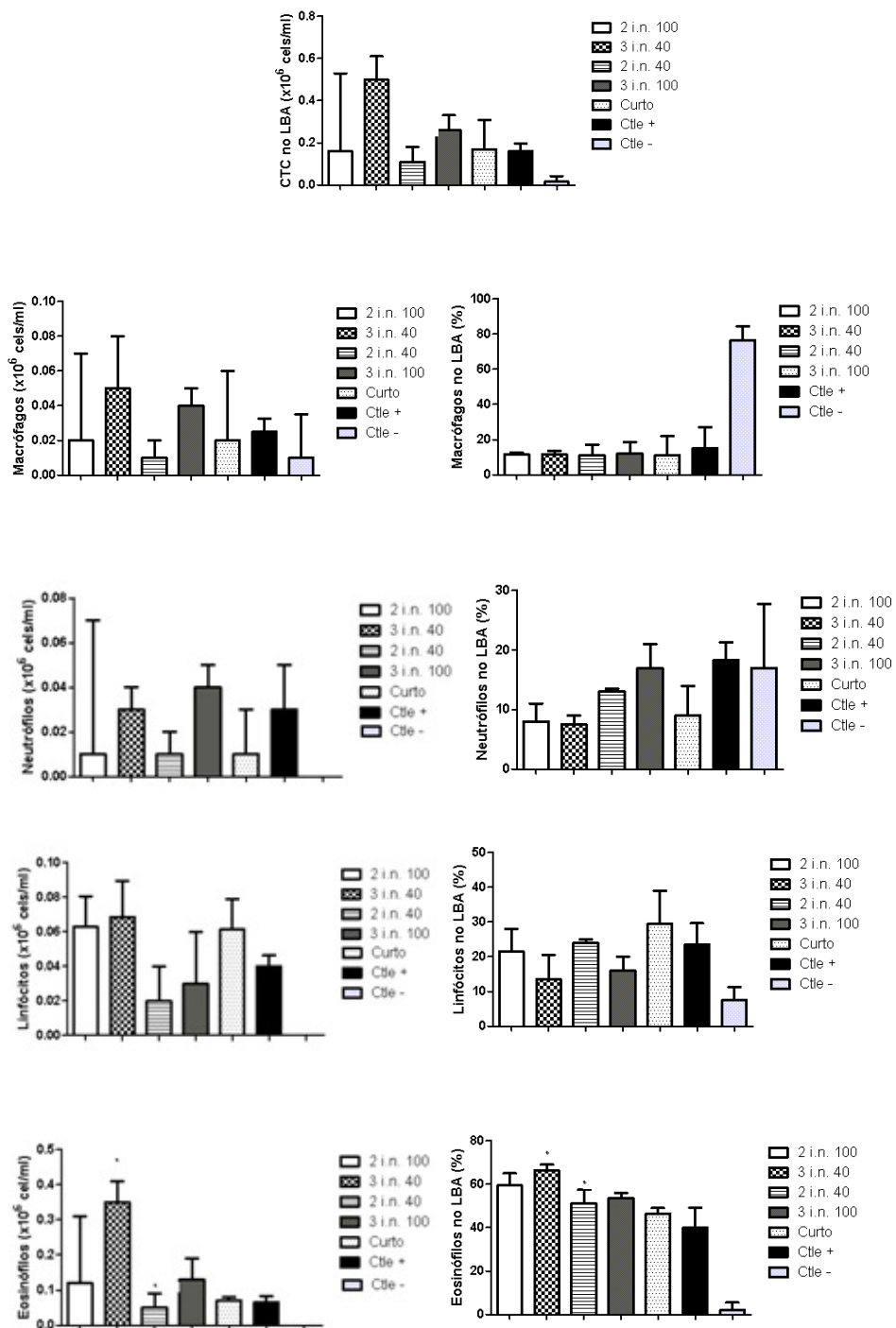
A média do retorno do LBA de todos os animais foi de 0,55 ml (DP:0,15) e a viabilidade celular média foi de 100%. A média de eosinófilos do LBA no grupo controle negativo foi de 2,5% (DP=3), e no controle positivo foi de 40,12% (DP = 10).

Em relação aos grupos estudados, não se observou diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao controle positivo, no que se refere à contagem total de células ( $p=0,108$ ), número de linfócitos ( $p=0,367$ ), macrófagos ( $p=0,241$ ) e neutrófilos ( $p=0,059$ ) no LBA. Em relação ao número de eosinófilos no LBA, o grupo 2 apresentou uma contagem maior de eosinófilos do que o grupo 3 ( $p=0,032$ ). Os resultados da comparação da contagem de células do LBA entre os grupos são apresentados na Figura 4. O grupo de curta duração (Grupo 5, de 10 dias), sem uso de adjuvante, apresentou uma resposta inflamatória celular nos pulmões semelhante ao protocolo amplamente utilizado na literatura em modelos de asma,

---

com duração de 21 dias. Quando os grupos estudados foram comparados ao controle negativo, todas as variáveis da contagem de células totais e diferenciais foram significativamente maior do que o controle negativo ( $p=0,035$ ).

---

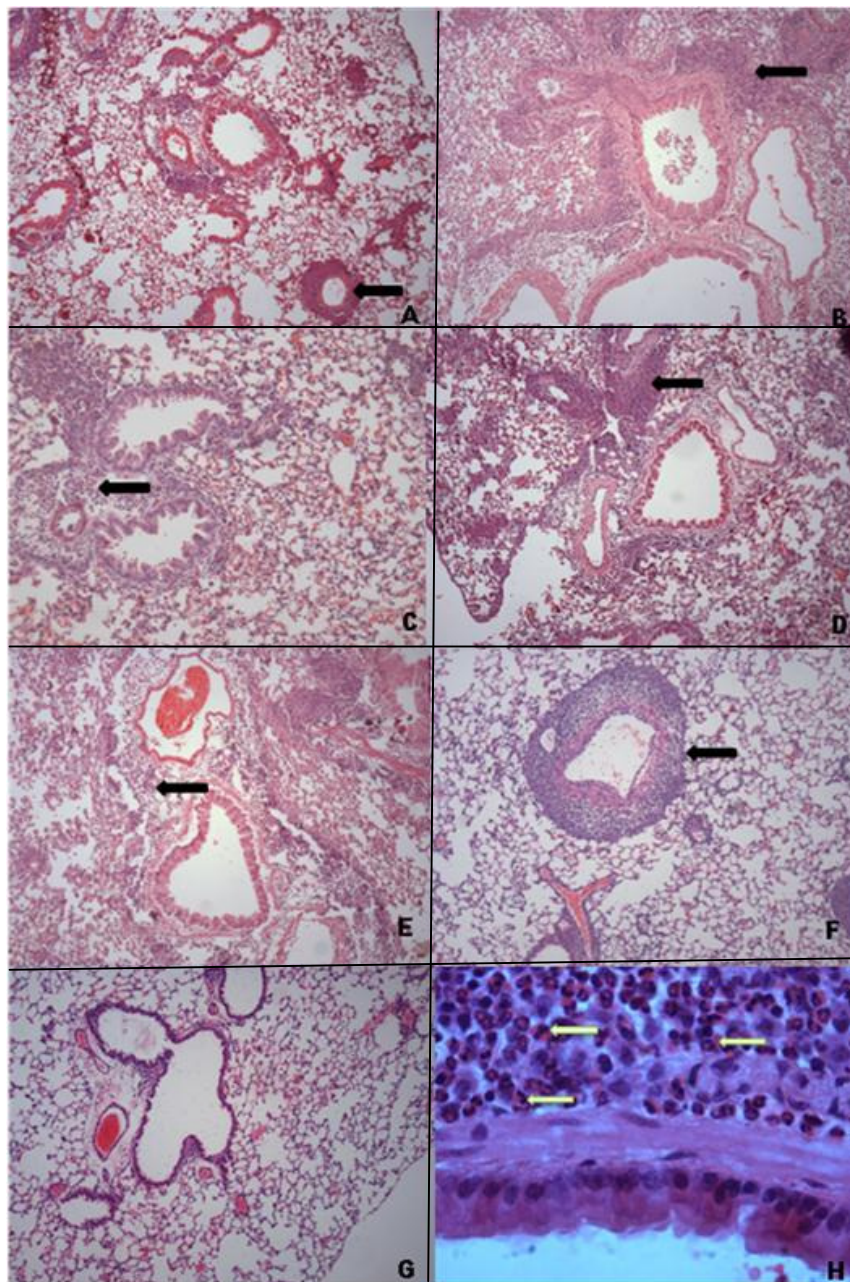


**Figura 2. Comparação da contagem total de células e da citologia diferencial no lavado broncoalveolar (número absoluto e percentual) entre os grupos estudados.** Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, com *post-hoc* de Dunn. \*  $p < 0,05$ . Para comparação entre os grupos e o controle negativo, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com ajuste de Finner ( $p = 0,035$ ), onde todas as variáveis foram significativamente maiores que o controle negativo.

A análise histológica demonstrou infiltrado inflamatório peribroncovascular intenso, com predomínio de linfócitos e presença de mais de 100 eosinófilos peribrônquicos por campo, em todos os grupos. O grupo controle negativo apresentou anatomia preservada, sem alterações inflamatórias, característico de animais saudáveis. Não houve diferença entre os grupos sensibilizados e desafiados com OVA, em relação à intensidade da inflamação pulmonar, do ponto de vista histológico, incluindo o grupo de curta duração (Figura 5). A análise dos níveis de EPO no tecido pulmonar não apresentaram diferença entre os grupos estudados. Figura 6.

---





**Figura 3. Análise histológica dos grupos de camundongos estudados. Presença de intenso infiltrado inflamatório peribrônquico e perivascular (de A-F, setas pretas) em todos os grupos sensibilizados.** O grupo de curta duração (Quadro E) apresenta alterações histopatológicas semelhantes aos outros grupos sensibilizados. A histologia dos pulmões dos animais com exposição apenas à DPBS (Controle negativo, Quadro G) apresenta brônquios com paredes de espessura normal, vasos com agregados linfóides perivascularares de distribuição normal e espaço alveolar permeável e aerado. (100X, coloração HE). No infiltrado, em todos os grupos, observa-se mais de 100 eosinófilos por campo (Quadro H, setas claras), sendo característico da resposta pulmonar alérgica nestes modelos.  
- A) 2 i.n. 40 µg; B) 2 i.n. 100 µg; C) 3 i.n. 40 µg; D) 3 i.n. 100 µg; E) Curto; F) Controle +; G) Controle -; H) Foto de intenso infiltrado intersticial de eosinófilos (1000X, HE).

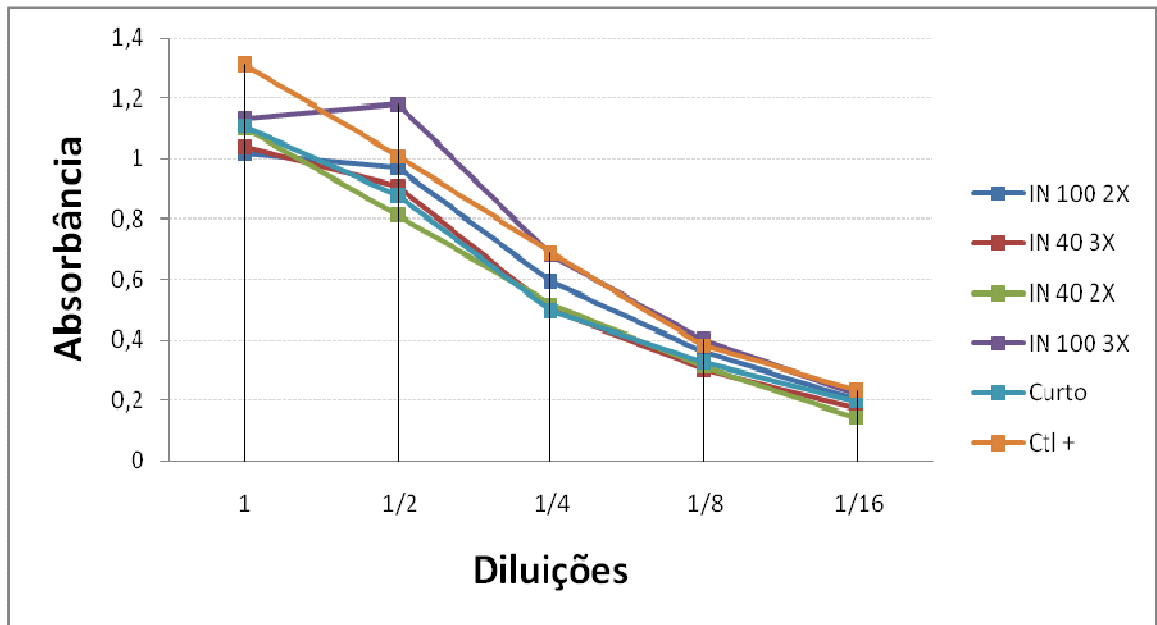


Figura 4. Análise do ensaio de atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) em tecido pulmonar entre os grupos estudados. Não houve significância estatística entre os grupos estudados.

## DISCUSSÃO

A busca de modelos animais de asma com protocolos com duração mais curta e sem uso de adjuvante parece uma alternativa atraente para pesquisas experimentais desta doença. No presente estudo, ao compararmos diferentes grupos de camundongos BALB/c sensibilizados com OVA, não observamos diferença significativa entre os diferentes protocolos estudados, utilizando as variáveis de desfecho mais relacionadas à atividade e presença de eosinófilos no pulmão, mesmo utilizando um protocolo bastante curto (10 dias).

O mais importante resultado do nosso estudo diz respeito ao tempo de duração dos protocolos, onde nenhuma diferença foi encontrada entre protocolos com diferentes tempos de duração (10, 21 e 28 dias), principalmente considerando que um adjuvante não foi utilizado. Os autores demonstraram pela primeira vez que um protocolo curto com OVA, sem adjuvante, resulta em uma resposta pulmonar alérgica significativa. A utilização de um protocolo de 10 dias com a mesma resposta eosinofílica pulmonar de modelos anteriormente mais longos utilizados amplamente na literatura, facilitaria a realização de testes pré-clínicos, principalmente na descoberta de novos alvos terapêuticos, permitindo a redução de custos e duração de experimentos. Protocolos mais curtos também seguem todos os preceitos éticos correntes em relação ao uso de animais em pesquisa, visto que os mesmos sofrem menor tempo de exposição a procedimentos em experimentos.

Em 2004, Cates et al publicaram um artigo utilizando o ácaro da poeira doméstica em um protocolo de 10 dias apenas com doses intranasais de 25 g/animal. De

---

---

acordo com os dados encontrados, houve um aumento da contagem total e diferencial (mononucleares e eosinófilos) de células no LBA em relação aos animais *naive*, bem como aumento de células CD4+ e CD8+. Também observou-se aumento da hiperresponsividade das vias aéreas à metacolina na dose de 33 g/Kg e aumento de IL-4 e IL-5 na cultura de esplenócitos. Este estudo, utilizando um outro alérgeno, encontrou resultados semelhantes ao nosso protocolo curto.

Já em 2008, Hahn & Erb publicaram um outro artigo questionando o tempo despendido para identificação e desenvolvimento de novos tratamentos para asma, que vai desde a identificação de uma molécula, a determinação se esta molécula está realmente envolvida no processo da doença, identificação dos componentes da sua estrutura e sua modificação sintética, até os testes pré-clínicos em animais.<sup>25</sup> Este processo, já longo e dispendioso o suficiente, ainda se soma aos longos períodos de experimentos com camundongos. É importante salientar que nossos resultados no modelo proposto envolvem somente a análise da resposta aguda a um alérgeno. Modelos experimentais de exposição crônica têm sido descritos e devem fazer parte de estudos de novos fármacos, provavelmente seguindo em uma seqüência posterior de experimentos.<sup>27-29</sup> No entanto, protocolos curtos podem ser um modelo interessante de triagem para novos alvos terapêuticos. Esta afirmação merece, porém, ainda ser testada com fármacos.

Vários autores têm criticado também o uso de hidróxido de alumínio (alum) em modelos murinos de asma, por não ser uma substância fisiológica, e que artificialmente induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativando linfócitos Th2.<sup>18, 23, 30</sup> O alum

---

---

ainda ativa o sistema imune via maturação de células dendríticas e pela co-estimulação de moléculas de expressão.<sup>19, 20</sup> Estudos realizados sem uso de alum demonstraram que o mesmo não é necessário na indução da resposta pulmonar alérgica em camundongos, não havendo diferença na sensibilização por via subcutânea sem uso de adjuvante em relação à via intraperitoneal com o uso do mesmo. Esses estudos utilizando protocolos sem adjuvante demonstraram diferentes níveis de inflamação, imunotolerância ao alérgeno ou protocolos muitas vezes longo demais.<sup>24, 31-34</sup> Conrad et al., mais recentemente, não mostrou diferença significativa em relação à celularidade no LBA, histologia pulmonar e níveis de interleucinas (IL-5, IL-10 e IL-13), utilizando sensibilização SC com OVA, sem adjuvante.<sup>1</sup> No entanto, neste estudo infelizmente foram utilizadas 3 sensibilizações, que tornam o experimento relativamente longo para um modelo sabidamente agudo de asma. Além disso, o alum demonstrou causar estresse importante nos animais, até 4 horas após a exposição. O mecanismo pelo qual a sensibilização SC é efetiva sem adjuvante não tem uma explicação ainda. Nossa hipótese é de que o primeiro compartimento tecidual pode ter um número maior e mais efetivo de células apresentadoras de antígenos, que resultam em uma resposta mais robusta a um alérgeno, sem a necessidade de adjuvante.

Na contagem de células do LBA, encontramos uma contagem de eosinófilos reduzida do LBA entre os grupos com uso de OVA SC (21 dias) que realizaram desafio intranasal (40µg) por 2 vezes, quando comparada ao que realizou o desafio por 3 vezes (Figura 2). Este achado pode ser explicado pelo fato de que o número menor de desafios intranasais de OVA induz menos inflamação no animal. Este achado, seguindo a lógica de raciocínio, não parece de maior importância nos nossos resultados.

---

No nosso estudo não foram realizadas mensurações de citocinas e de IgE específica para OVA. Em virtude de não estarmos estudando nenhum mecanismo de doença, acreditamos que a análise utilizada neste trabalho, focada principalmente na atividade eosinofílica no pulmão, não altera a interpretação final dos resultados de forma geral.

Concluindo, novos modelos de asma utilizando doses menores de OVA, com menor número de sensibilizações, menor número de desafios intranasais e ausência de uso de adjuvante mostraram uma resposta inflamatória pulmonar com predomínio de células efectoras (eosinófilos). Este modelo proposto pelos autores pode ser uma opção futura para experimentos mais curtos e de menores custos. No entanto, a utilização deste protocolo (10 dias e sem adjuvante) em testes pré-clínicos para novas terapias focadas em asma aguda e resposta pulmonar eosinofílica deve ser futuramente validada com estudos utilizando fármacos já estabelecidos no tratamento da asma, que consolidaria sua implementação na pesquisa experimental desta doença.

---

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kilic A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*. [Comparative Study]. 2009 Aug;39(8):1246-54.
  2. Pitrez PMC, Stein, R.T., Martinez F.D. The Global Burden of Asthma. In: Taussig LM, Landau, L.I., Le Souëf, P.N., Martinez, F.D., Morgan, W.J., Sly, P.D., editor. *Pediatric Respiratory Medicine*. Philadelphia: Elsevier; 2008. p. 779-81.
  3. Delayre-Orthez C, Becker J, de Blay F, Frossard N, Pons F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Dec;138(4):298-304.
  4. Bates JH, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2009 Sep;297(3):L401-10.
  5. Shichijo M, Inagaki N, Nakai N, Kimata M, Nakahata T, Serizawa I, et al. The effects of anti-asthma drugs on mediator release from cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Oct;28(10):1228-36.
  6. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy*. [Review]. 2007 Jul;37(7):973-88.
  7. Szelenyi I. Animal models of bronchial asthma. *Inflamm Res*. [Review]. 2000 Dec;49(12):639-54.
  8. Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. [Review]. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B12-7.
  9. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med*. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2002;53:477-98.
  10. Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. [Editorial Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. 2008 Mar;121(3):603-6.
  11. Epstein MM. Are mouse models of allergic asthma useful for testing novel therapeutics? *Exp Toxicol Pathol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2006 Jun;57 Suppl 2:41-4.
  12. Kumar RK, Herbert C, Foster PS. The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 Jun;9(6):485-94.
  13. Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, Chi EY, Henderson WR, Jr., Lewis DB. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med*. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1997 Feb;155(2):661-9.
-

14. Fuchs B, Braun A. Improved mouse models of allergy and allergic asthma - chances beyond ovalbumin. *Curr Drug Targets*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2008 Jun;9(6):495-502.
  15. Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hiwada K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clin Exp Immunol*. 1999 Oct;118(1):9-15.
  16. Kurup VP, Mauze S, Choi H, Seymour BW, Coffman RL. A murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis with elevated eosinophils and IgE. *J Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 1992 Jun 15;148(12):3783-8.
  17. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, et al. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. [Review]. 2003 Aug;22(2):374-82.
  18. Eisenbarth SC. Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy*. [Editorial]. 2008;38:1572-5.
  19. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Apr 14;205(4):869-82.
  20. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2003 Oct 2;425(6957):516-21.
  21. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Apr;282(4):L833-9.
  22. Nials AT, Uddin S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*. [Review]. 2008 Nov-Dec;1(4-5):213-20.
  23. Shapiro S. Animal Models of Asthma Pro: Allergic Avoidance of Animal (Model) is not an Option. *Am J Crit Care*. [Editorial]. 2006;174:1171-8.
  24. Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irvin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1992 Jun;89(6):1127-38.
  25. Hahn C, Erb KJ. The preclinical testing strategy for the development of novel chemical entities for the treatment of asthma. *Curr Drug Targets*. [Review]. 2008 Jun;9(6):443-51.
  26. 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 Nov 7;83(2):209-15.
  27. Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Swirski FK, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Feb 1;169(3):378-85.
-



- 
28. Fattouh R, Al-Garawi A, Fattouh M, Arias K, Walker TD, Goncharova S, et al. Eosinophils are dispensable for allergic remodeling and immunity in a model of house dust mite-induced airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jan 15;183(2):179-88.
  29. 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*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Nov 15;173(10):6384-92.
  30. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1999 Dec 15;163(12):6448-54.
  31. Clausen SK, Bergqvist M, Poulsen LK, Poulsen OM, Nielsen GD. Development of sensitisation or tolerance following repeated OVA inhalation in BALB/cJ mice. Dose-dependency and modulation by the Al(OH)<sub>3</sub> adjuvant. *Toxicology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Feb 14;184(1):51-68.
  32. Van Hove CL, Maes T, Joos GF, Tournoy KG. Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 May;36(5):573-84.
  33. Keller AC, Mucida D, Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AM, Rodriguez D, et al. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;117(2):283-90.
  34. Holt PG, Reid M, Britten D, Sedgwick J, Bazin H. Suppression of IgE responses by passive antigen inhalation: dissociation of local (mucosal) and systemic immunity. *Cell Immunol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1987 Feb;104(2):434-9.
-