

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM MEDICINA**

FERNANDA PAULA MARTINS SOLER

**EFEITO DA DEXAMETASONA NA ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA EM
FILHOTE DE RATOS**

São Paulo

2021

FERNANDA PAULA MARTINS SOLER

**EFEITO DA DEXAMETASONA NA ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA EM
FILHOTE DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Stella Regina Zamuner

São Paulo

2021

Soler, Fernanda Paula Martins.

Efeito da dexametasona na asma experimental induzida em filhote de ratos. / Fernanda Paula Martins Soler. 2021.

41 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a Stella Regina Zamuner.

1. Asma. 2. Asma resistente a glicocorticoide. 3. Ovalbumina.
- I. Zamuner, Stella Regina. II. Título

CDU 616



São Paulo 29 de junho de 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **FERNANDA PAULA MARTINS SOLER**

Título da Dissertação: **"EFEITO DA DEXAMETASONA NA ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA EM FILHOTES DE RATOS"**.

Presidente: **PROFA. DRA. STELLA REGINA ZAMUNER**

Membro: **PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR**

Membro: **PROFA. DRA. MARICILIA SILVA COSTA**

Dedico esse trabalho à Deus, à meu esposo Leandro Pavanello que sempre me apoia em todas as decisões profissionais e acadêmicas e me dá o suporte para que eu possa me dedicar aos estudos, aos meus filhos Enzo e Manoela que me inspiram diariamente a querer ser sempre alguém melhor para eles, e me fazem manter o equilíbrio entre a vida profissional e a familiar, à meus irmãos Adriano e Luciana que sempre foram minha fonte de inspiração aos estudos, e que me mostraram desde muito cedo o mundo acadêmico, aos meus pais, por me trazerem ao mundo e me ensinarem a força, perseverança e humildade e por fim, à minha maravilhosa orientadora Dra. Stella Zamuner, sem a qual nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora Dra. Stella, por ser a pessoa maravilhosa e a profissional exemplar, por me orientar e ser tão paciente com seus orientandos, mesmo num momento tão difícil de nossas vidas nos últimos 2 anos de pandemia.

À professora Dra. Adriana Lino, que me inspirou com sua paixão pelos projetos com formaldeído a trabalhar com asma, e por me dar o suporte e o ensinamento inicial do projeto.

À minha aluna de iniciação científica Janaina por participar e me ajudar em diversos experimentos com animais.

À Amanda, colega de pós-graduação, por me ajudar e me lembrar a mexer nos microscópios e lâminas de histologia que faziam parte da minha vida apenas nos primeiros semestres da graduação.

Ao meu esposo que ficou com nossos filhos muitas noites para que eu pudesse estudar e escrever até mais tarde e fez muitos plantões por mim para que eu pudesse me dedicar ao mestrado. E ao meu irmão Adriano e minha cunhada Caroline que me incentivaram e auxiliaram a dar os primeiros passos no mundo acadêmico, me auxiliando nos passos mais basais de escrita e pesquisa.

Agradeço também à Universidade Nove de Julho por me dar a oportunidade de realizar o mestrado e o apoio financeiro através da bolsa de estudos, para que eu possa realizar esse projeto.

"A diferença entre o sonho e a realidade é a quantidade certa de tempo e trabalho."

(William Douglas)

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 340 milhões de pessoas sofrem de asma. A asma é uma doença crônica caracterizada por broncoconstrição, aumento na secreção do muco e hiperreatividade brônquica, sendo esses decorrentes da liberação de mediadores inflamatórios no local. Apesar do tratamento da asma ter evoluído muito nas últimas décadas com os tratamentos de corticosteroides orais e inalatórios, uma parte dos pacientes asmáticos não respondem ao tratamento, necessitando de altas doses de corticoterapia ou apresentam asma refratária grave. Assim, é razoável supor que estudos que visem promover uma hiperreatividade em filhotes de ratos podem constituir ferramentas interessantes para a compreensão da asma resistente a glicocorticoide. Neste sentido, nossos objetivos foram investigar a repercussão pulmonar da exposição de filhotes de ratos com asma experimental induzida. Para tal, dividimos filhotes de ratos em 3 diferentes grupos, sendo grupo controle, grupo exposto a ovalbumina para desencadear a resposta imunológica inata do animal e grupo exposto a ovalbumina e tratado com dexametasona a fim de mimetizar a asma resistente a glicocorticoide. Foram realizadas a contagem total e diferencial de células inflamatórias no lavado broncoalveolar do pulmão dos filhotes de ratos, e seus pulmões foram coletados para análise histopatológica. Nosso resultado demonstrou aumento de células totais e mononucleares no lavado broncoalveolar dos pulmões dos animais tratados com dexametasona, aumento de polimorfonucleares no grupo tratado com dexametasona em relação ao controle, porém não houve aumento em relação ao grupo exposto a ovalbumina. Na análise morfométrica, nosso resultado evidenciou aumento de celularidade total no grupo exposto a ovalbumina em relação ao controle e pouca diferença em relação ao grupo tratado com dexametasona. Foi evidenciado diminuição de muco nos pulmões tratados com dexametasona entretanto não mostrou diferença em relação a desgranulação mastocitária podendo sugerir a ativação de uma via distinta de Th2, sendo necessários estudos aprofundados do perfil imunológico para auxiliar os indivíduos impactados com a asma refratária a glicocorticoide.

Palavras chave: Asma; asma resistente a glicocorticoide; ovalbumina.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), more than 340 million people conform to asthma. Asthma is a chronic disease characterized by bronchoconstriction, increased mucus secretion and bronchial hyperreactivity, which result from the release of inflammatory mediators at the site. Although the treatment of asthma has evolved a lot in recent decades with the treatment of oral and inhaled corticosteroids, a part of asthmatic patients does not induce treatment, requiring high doses of corticosteroid therapy or severely refractory asthma sheath. Thus, it is reasonable to assume that studies aimed at promoting hyperreactivity in rat pups can be interesting tools for understanding glucocorticoid-resistant asthma. In this sense, our objective was to investigate a pulmonary repercussion of the exposure of rat pups with experimental induced asthma. To this end, we divided rat pups into 3 different groups: a control group, a group exposed to ovalbumin to trigger the animal's innate immune response, and a group exposed to ovalbumin and treated with dexamethasone to mimic glucocorticoid-resistant asthma. Total and differential inflammatory cell counts in the bronchoalveolar lavage of the lungs of rat pups were performed, and their lungs were collected for histopathological analysis. Our result was an increase in total and mononuclear cells without bronchoalveolar lavage in the lungs of animals treated with dexamethasone, an increase in polymorphonuclear cells in the group treated with dexamethasone compared to the control group, but there was no increase compared to the group exposed to ovalbumin. In the morphometric analysis, our result showed an increase in total cellularity in the group exposed to ovalbumin compared to the control and a difference in relation to the group treated with dexamethasone. A decrease in mucus was evidenced in the lungs treated with dexamethasone, however undifferentiated in relation to mast cell degranulation, suggesting the activation of a distinct Th2 pathway, and in-depth studies of the immunological profile to assist guests impacted with glucocorticoid-refractory asthma were examined.

Key words: asthma; glucocorticoid-resistant asthma; ovalbumin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Critérios para o diagnóstico da Asma de Difícil Controle	20
Figura 2	Células inflamatórias em pulmão de filhotes de ratos em resposta a exposição de OVA e tratamento com dexametasona.....	28
Figura 3	Cortes histológicos de pulmão de filhote de rato Wistar em aumento de 20x, corados por HE.....	30
Figura 4	Cortes histológicos de pulmão de filhote de rato Wistar em aumento de 20x, corados por Azul Toluidina.....	32
Figura 5	Cortes histológicos de pulmão de filhote de rato Wistar em aumento de 20x, corados por PAS	33

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
1.1.	Asma.....	13
1.1.2.	Definição.....	13
1.1.3.	Epidemiologia.....	15
1.1.4.	Fatores de risco.....	15
1.1.5.	Fisopatologia.....	18
2.	Objetivos	22
2.1.	Objetivo geral.....	22
2.2.	Objetivo específico.....	22
3.	Material e Métodos	23
3.1.	Animais.....	23
3.2.	Indução da asma experimental.....	23
3.3.	Indução da asma resistente a glicocorticoide.....	24
3.4.	Eutanásia.....	24
3.5.	Quantificação total de células do lavado broncoalveolar.....	25
3.6.	Análise histológica dos pulmões dos animais.....	25
3.7.	Análise estatística.....	26
4	Resultados	27
4.1	Efeito do tratamento com dexametasona na análise do lavado broncoalveolar do pulmão de filhotes de ratos com asma experimental.	27
4.2	Efeito do tratamento com dexametasona no corte histológico em pulmão de filhotes de ratos com asma experimental corados com HE..	29
4.3	Efeito do tratamento com dexametasona na transmigração mastocitária em pulmão de filhotes de ratos com asma experimental corados com Azul de Toluidina.....	31
4.4	Efeito do tratamento com dexametasona na produção de muco em pulmão de filhotes de ratos com asma experimental corados com PAS.....	33
5.	Discussão	24
6.	Conclusão	37
7.	Referências	38
8.	Anexo	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma

1.1.1. Definição

Caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, a asma é uma patologia heterogênea com diferentes fenótipos e endótipos que cursa com sintomas respiratórios (sibilos, dispneia, opressão torácica e tosse) e variações no que diz respeito a tempo, intensidade e fluxo aéreo, os quais podem ser o resultado de interações diversas, como aquela entre a genética, exposição ambiental a alérgenos e irritantes, além de outros fatores que podem estar envolvidos no surgimento e manutenção dos sintomas inflamatórios advindos da asma (NASCIMENTO, Eduardo Castelã, 2020; Reddel, H et al, 2021). Globalmente, foi criada uma iniciativa chamada Global Initiative for Asthma – GINA que define ser uma doença crônica das vias aéreas resultante da participação de várias células. A inflamação crônica esta associada com a hiperresponsividade das vias aéreas, levando a episódios recorrentes de sibilancia, tosse particularmente à noite ou no início da manhã e dispneia. A obstrução do fluxo aéreo é variável e pode ser reversível espontaneamente sem tratamento, bem como através de terapia broncodilatadora (Masoli et al, 2004; Asher et al, 2006; GINA, 2018).

1.1.2. Epidemiologia

Considerada mundialmente uma das doenças não transmissíveis mais comuns da atualidade, a asma impacta cerca de 340 milhões de pessoas em todo o planeta. No Brasil, através dos consensos e diretrizes nacionais para o manejo da asma, e de acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia, anualmente ocorrem cerca de 350 mil internações (GINA, 2018).

Dados do International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISAAC) apontam que: enquanto os países de língua inglesa e América Latina podem ter a maior prevalência de asma, a doença parece ser menos reconhecida e mais grave na África, no subcontinente indiano e no leste Mediterrâneo (Lai, C.K.W et al., 2009). Na

América do Norte e Europa Ocidental, a prevalência dos sintomas da asma vêm sendo reduzidas (GINA, 2018).

As doenças respiratórias mais comuns na infância apresentaram um expressivo aumento na sua prevalência e morbidade nas últimas décadas. Alguns fatores tentam explicar os aumentos: o melhor reconhecimento da doença; mudanças no estilo de vida, com maior permanência em ambientes fechados e modificações dos hábitos alimentares; contribuição de fatores infecciosos e socioeconômicos e concentração exacerbada de poluentes ambientais. Até 2025, há estimativa de crescimento populacional na região urbana de 45% para 59% em todo o mundo, aumentando assim a prevalência da asma (THOMAS A.E et al., 2015; Bousquet et al, 2007).

No Brasil, assim como no resto do globo, esta patologia afetou indivíduos de todas as idades, contribuindo dessa maneira, para muitas mortes no mundo, incluindo jovens. Além disso, ela é responsável por um altíssimo custo total (direto e indireto) de aproximadamente 800 milhões de reais para a saúde brasileira (NASCIMENTO, E.C, 2020; GINA, 2018). Além de um alto custo nos sistemas de saúde, e mortalidade, ela é responsável por um grande aumento na morbidade da população, pois pode causar perda da produtividade da sociedade no trabalho especialmente quando se trata de crianças por comove toda a família (Reddel, H et al, 2021, Souza-Machado et al, 2010). A asma também causa impacto na população economicamente ativa, devido absenteísmo no trabalho e gastos com medicações e internações frequentes, inclusive de crianças em idade escolar. Reduz a qualidade de vida do indivíduo pois gera restrição de atividade física, fadiga, distúrbios do sono entre outros (Souza-Machado et al, 2010). Felizmente, dados da Base de dados do Sistema Único de Saúde (DataSUS), mostram significativa redução das hospitalizações nos últimos 10 anos, representando grandes avanços no controle e manejo da doença. Em 2011 foram mais de 178 mil hospitalizações em todo território nacional, enquanto que em 2020, os dados representaram cerca de 47 mil internações, correspondendo a uma redução de aproximadamente 73% (Ministério da Saúde, DataSUS, 2021).

1.1.3. Fatores de risco

De etiologia multifatorial, a asma pode ser desencadeada através dos fatores genéticos, fatores ambientais, ou mesmo a associação de ambos os fatores. Atualmente, devido a refratariedade de tratamento, observa-se que a asma pode ter diferentes fenótipos e diferentes genes envolvidos. Além dos fatores genéticos, é muito importante na avaliação dos fatores ambientais, uma vez que podem agir em conjunto com os fatores genéticos e aumentar a gravidade da asma. Os estímulos desencadeantes são diversos: drogas, estresse, exercício físico, poluentes, alérgenos, tabagismo ativo e passivo, mudanças climáticas, animais domésticos etc (GINA, 2011).

1.1.4. Fisiopatologia

A asma é caracterizada por infiltração celular pulmonar e hiperresponsividade das vias aéreas, sendo esta última relacionada mundialmente aos efeitos tóxicos de mediadores liberados nos pulmões por macrófagos alveolares, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (Bochner e Busse, 2005).

Uma das principais células envolvidas na hiperresponsividade induzida pelo antígeno são os mastócitos, que estão amplamente distribuídos nas vias aéreas, como por exemplo, na anafilaxia e asma atópica. Após a ativação, essas células liberam um número de mediadores que compartilham um amplo espectro de funções inflamatórias e regulatórias nas vias aéreas e pulmões (Galli et al., 2005; Mota Pinto e Todo-Bom, 2009), incluindo aqueles associados à contração do músculo liso das vias aéreas (Galli et al., 2005). O leucotrieno B₄ (LTB₄) é um potente agente contrátil das vias aéreas e é responsável pela hiperresponsividade das vias aéreas (Miyahara et al., 2009). Por outro lado, o óxido nítrico (NO), também liberado pelos mastócitos, exerce efeitos relaxantes sobre o músculo liso das vias aéreas, desempenhando, portanto, um importante papel regulador no tônus das vias aéreas (Fischer et al., 2002). Portanto o NO é um modulador bem reconhecido da interação leucócito-endotelial, controlando a adesão de leucócitos no endotélio durante o processo inflamatório (Ricciardolo et al., 2006), enquanto o PECAM-1 está envolvido principalmente com adesão celular e transmigração (Scalia e Lefer, 1998).

Embora os mecanismos fisiopatológicos da asma ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que estímulos variados, inclusive exposição a alérgenos, podem precipitar as crises mais graves desta patologia, em cujos linfócitos Th2 da mucosa induzem a síntese de IgE por meio dos plasmócitos e do resultado da ação do aumento de citocinas, proteínas secretadas por células imunológicas que desempenham atividades diversas (mediação de respostas imunes e inflamatórias) e estão associadas à inflamação asmática (Todo-Bom e Pinto, 2006). Portanto em indivíduos predispostos geneticamente, os linfócitos T CD4+ se diferenciam em linfócitos Th2, os quais produzem citocinas que correspondem a resposta humoral, sendo elas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13. Tais citocinas estimulam então a produção de IgE, estimulam a proliferação de mastócitos e aumentam a sobrevivência dos eosinófilos. Uma vez sensibilizado, quando exposto novamente ao antígeno, a IgE se liga a receptores de alta afinidade expressos em mastócitos e basófilos e induzem a desgranulação mastocitária, havendo então a liberação de mediadores pró-inflamatórios como histamina, leucotrienos e citoninas que aumentam a permeabilidade celular, promovendo a cascata inflamatória (Harris et al, 1995).

As citocinas são glicoproteínas diversas com a função de sinalização intercelular liberadas por células imunológicas em resposta a uma variedade de estímulos, o que lhe permite modular a resposta de muitas células. Também chamadas de moléculas, as citocinas são polipeptídeos hidrossolúveis de tamanhos variados que se dividem conforme sua forma estrutural e as funções que podem desempenhar, uma vez que há aquelas produzidas pelos Linfócitos T CD4 do tipo Th1 ou as do tipo Th2 (CAMPOS, 2007).

Nesse contexto se inserem as interleucinas (IL) que, produzidas por células hematopoiéticas (Th1 e Th2) estão diretamente ligadas à inflamação. Ademais, são ainda citocinas os interferons (IFN), os fatores estimulantes de colônia (CSF), os fatores de necrose tumoral (TNF) e os fatores de crescimento e quimiocinas, também responsáveis pela resposta imunológica mediada por células, especialmente no processo inflamatório da asma (CAMPOS, 2007).

O aumento das citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) está claramente associado à inflamação da asma, segundo estudos de Todo-Bom e Pinto, em 2006, quando foi verificado que a IL-16 quando sintetizada por linfócitos T promove a frenagem nas vias aéreas como uma resposta inflamatória ao antígeno mediado por

Th2, que através da imunomodulação conserva a capacidade de quimiotaxia das células. Assim, a IL-16, como resposta no epitélio à estimulação antigênica, inibe a proliferação do linfócito T através de seu receptor (TCR), o que provoca uma redução na produção de IL-4 e IL-5 realizada pelo linfócito T sensibilizado.

Estudos mais abrangentes apuraram que na asma, por ser ela o resultado da interação entre fatores genéticos e ambientais, um aumento dos genes inflamatórios determina alterações celulares e estruturais do aparelho respiratório e modula diferentes fenótipos asmáticos, isto é, uma interação entre a variada rede imune pulmonar e as células presentes nas vias aéreas produz a asma e que os corticosteroides podem suprimir a inflamação revertendo a acetilação da histona promovida pelos genes (CAMPOS, 2007).

Por isso, o processo inflamatório da asma é bastante complexo e do qual participam múltiplas células e mediadores, como todas as células do aparelho respiratório, inclusive as constitutivas, antes consideradas sem potencial inflamatório. Dentre as células envolvidas na inflamação da asma, destacam-se as citocinas, como as interleucinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13; fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); fator de necrose tumoral (TNF- α); fator transformador do crescimento-beta (TGF- β); radicais reativos de oxigênio, como ânion peróxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas e peróxido nitrito; produtos granulares pré-formados, proteína básica principal (PBP) do eosinófilo, proteína catiônica eosinofílica (PCE); histamina e triptase do mastócito; mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos e o fator ativador de plaquetas -FAP); moléculas de adesão, como a molécula intracelular de adesão-1 (ICAM-1), a molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) além de selectinas (CAMPOS, 2007).

Histologicamente, a despeito do genoma do camundongo, este só foi completamente decodificado recentemente, no início do século XXI, o que foi realizado com base na codificação do genoma humano. A partir disso, estudos histológicos análogos para analisar a sensibilização de camundongos a alérgenos apuraram forte resposta Th2 nos pulmões com níveis de IgE para o antígeno, que permitiram recrutamento e ativação de eosinófilos com redução do calibre das vias aéreas onde houve ação de agentes broncoconstritores, os quais destacaram ainda a relevância das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 na fisiopatologia da reação alérgica (GUALDI et al., 2010).

Do ponto de vista histopatológico, a resposta asmática imediata ocorre com a desgranulação mastocitária e liberação de mediadores inflamatórios que promovem aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso, edema de mucosa, produção de muco, causando os sintomas de hiperresponsividade brônquica. Ademais, análises histológicas análogas já demonstraram certo padrão de inflamação eosinofílica alveolar, o que significa quadro inflamatório instalado na região pulmonar incompatível com os parâmetros considerados dentro da normalidade, sugerindo a presença de alguma doença respiratória prévia, acelerando a deterioração e morte de algumas cobaias (GUALDI et al., 2010). A fase tardia ocorre com leucócitos recrutados (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos). Nessa fase ocorre eosinofilia nas vias aéreas e liberação de mais mediadores pró-inflamatórios que causam sintomas da fase tardia como obstrução brônquica, persistência dos sibilos e remodelamento pulmonar (Homma et al, 2005).

1.1.5. Asma resistente a glicocorticoide

As drogas amplamente difundidas no tratamento da asma são os corticosteroides. Seu uso diminui o processo inflamatório, hospitalizações e mortalidade, porém parece não estar relacionado ao retardo do remodelamento. Além do mais, é uma medicação com diversos efeitos adversos, inclusive quando usado na forma inalatória (Ernst e Suissa, 2012).

A asma resistente ou refratária é aquela do tipo grave em que os glicocorticoides, tratamento de primeira linha para esta patologia e de eficácia comprovada devido ao seu amplo espectro antiinflamatório, não tem efetividade, mesmo após o recomendado aumento da dose para estes casos. Apesar de impactar um percentual ainda parco de asmáticos (menos de 10%), a asma refratária desafia os estudiosos a buscarem cada vez mais opções terapêuticas que possam controlar com segurança todas as variações fenotípicas dessa doença (VERGANI, 2017).

Para que seja feito o diagnóstico da asma resistente a glicocorticoide é importante que antes seja avaliado e descartado outras patologias que possam estar envolvidas no diagnóstico diferencial de sibilância crônica, bem como outros fatores que possam estar associados, tais como, mau uso da técnica no manejo de inaladores dosimetrados, fatores psicológicos, má adesão ao tratamento, que podem estar

associadas à falha de tratamento. Além disso, precisa ser levado em consideração que alguns pacientes tem uma depuração mais rápida do glicocorticoide, geralmente devido interação medicamentosa com alguns anticonvulsivantes como fenitoína, carbamazepina e fenobarbital, outros apresentam má absorção e a troca do tipo de glicocorticoide pode surtir efeito. Se tudo isso for levado em consideração e mesmo assim não houver resposta terapêutica, durante um período de avaliação clínico-funcional por 3 a 6 meses, estamos diante de um fenótipo resistente a glicocorticoide. (LEUNG, Donald YM; SZEFLER, Stanley J, 1997).

Não existe uma definição universalmente aceita de asma resistente a esteroides. Corrigan et al definiram como a falha em demonstrar aumento no Volume Expiratório Final (VEF) basal em mais de 15% após 1 semana de Prednisona 20mg/dia oral, seguido por mais 1 semana com Prednisona 40mg/dia. Já Kamada e cols, após avaliar a resposta ao glicocorticoides em crianças concluíram que a falha terapêutica após 7 a 14 dias de terapia sistêmica com altas doses de glicocorticoides (maior ou igual a 20 mg 2x ao dia) indica uma baixa responsividade a esteroides. (LEUNG, Donald YM; SZEFLER, Stanley J, 1997).

Se levarmos em consideração os critérios clínicos das sociedades American Thoracic Society e da European Respiratory Society, teremos uma série de critérios, onde são necessários pelo menos um critério maior e dois critérios menores para o diagnóstico da asma de difícil controle ou resistente a glicocorticoide (figura 1).

Figura 1 – Critérios para o diagnóstico da Asma de Difícil Controle

CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA ASMA DE DIFÍCIL CONTROLE	
<u>CRITÉRIOS MAIORES</u>	<u>CRITÉRIOS MENORES</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Altas doses de corticoide inalatório (CI em mcg/dia): <ul style="list-style-type: none"> • Adultos: Beclometasona > 2000; Budesonida > 1600; Fluticasona > 1000\ • Crianças: Beclometasona ou Budesonida > 800; Fluticasona > 400 • Corticosteróides orais > 50% dos dias do ano 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de outro medicamento diário além dos CI <ul style="list-style-type: none"> • LABA, antagonistas dos leucotrienos ou teofilina • Necessidade diária ou quase diária de Beta-2-agonistas de curta duração • Obstrução persistente do fluxo aéreo <ul style="list-style-type: none"> • VEF-1 < 80% previsto, variação diurna do pico de fluxo expiratório >20% • Uma ou mais exacerbações com necessidade de ida a pronto-socorro por ano • Piora rápida após redução de pelo menos 25% da dose de corticosteróides orais ou CI • História anterior de exacerbação de asma quase fatal

Combinação dos critérios American Thoracic Society 2000 e European Respiratory Society 1999. CI: corticosteróides inalatório; LABA: beta agonista de ação prolongada; VEF-1: volume expiratório forçado no primeiro segundo.

A resistência a glicocorticoide dos pacientes asmáticos se deve, segundo estudos, às mucinas MUC1 e MUC4, proteínas de membrana que parecem modular o uso das drogas fazendo com que estas interajam com os receptores de glicocorticoides (α -glicocorticoide) e diminuem a sua ação inflamatória, tornando este grupo de pacientes insensíveis aos efeitos dos glicocorticoides. (VERGANI, 2017).

Nesse contexto, as interações entre as mucinas MUC1 e MUC4 e os glicocorticoides resultam em mais de 15 mutações, como alterações nas funções dos receptores glucocorticoides (GRs) nos leucócitos do sangue periférico e em fibroblastos, reduz a afinidade do GR pelo cortisol e o número dos GRs, a termolabilidade do GR e causa anormalidades na ligação do complexo GR com o DNA, todas contribuem para a resistência ao tratamento do asmático baseado em esteróides, além de outras anormalidades de resposta imunocelular relacionadas aos linfócitos T, com persistente ativação não responsiva ao corticoide, eosinófilos e monócitos. (FILHO, 2021).

Além disso, observou-se que as interleucinas IL-4 e IL-13, indutoras da produção de IgE, secreção de muco e fibrose. A IL-5 estimula a inflamação eosinofílica

e dano tecidual. A IL-33 facilita a ativação de TH2 causando toda sintomatologia comum da asma. Porém não explica toda persistência da asma grave, sugerindo a existência de mecanismos inflamatórios não oriundos de Th2, como a IL-17 (MATSUMURA Y, 2010).

Por estas razões, investigar os efeitos de glicocorticoides a partir da asma induzida em filhotes de ratos é tão importante, para esclarecer por meio de análise histológica, quais mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da asma refratária e de que maneira interferem e impactam a vida dos pacientes que apresentam resistência ao tratamento de primeira linha para esta patologia: a corticoterapia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do glicocorticoide em asma induzida em filhotes de ratos.

2.2. Objetivo específico

Avaliar a quantidade de células inflamatórias no lavado broncoalveolar.

Análise histológica do pulmão dos animais, evidenciando a migração de células, a produção de muco e a desgranulação mastocitária.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e aprovado sob o número de protocolo CEUA nº 4467110619.

Assim, desenvolvemos esse estudo experimental, intervencional e randomizado. Os procedimentos foram realizados no Biotério da UNINOVE, atendendo às Normas Éticas para Experimentação Animal do Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), as normas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCALCOBEA) e a legislação nacional atual sobre Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Federal 11.794, de 9 de outubro de 2008).

3.1. Animais

Foram utilizados filhotes de ratos da raça Wistar. Após o nascimento, os filhotes ficaram com as mães até o desmame (em torno de 21 dias pós nascimento). Os animais ficaram em uma sala com temperatura controlada, 12/12h ciclo claro-escuro a 21°C, com acesso livre a água e comida.

Quinze dias após o nascimento, os filhotes foram escolhidos e distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais de 10 animais para cada grupo experimental. O experimento foi todo realizado antes da fase de maturação sexual (em torno de 45 dias pós nascimento) para garantir que eram filhotes.

A prole foi dividida em 3 grupos experimentais:

Grupo I – grupo controle

Grupo II – grupo OVA

Grupo III – grupo OVA + Dexametasona

3.2. Indução da Asma Experimental

Todos os animais, exceto o grupo controle, foram imunizados com 15 dias pós-nascimento, correspondendo ao dia 1 do experimento com uma solução de

ovalbumina em PBS (OVA grau V, 20 µg SC) emulsionada com adjuvante de Freud (AF, 75 µl) para desafiar o sistema imunológico inato.

Nos Dias 21 e 22 os animais foram expostos ao desafio inalatório com 10 ml de uma solução de OVA grau II a 1% por 15 minutos em dias consecutivos; Após 24h da última inalação as análises foram realizadas.

3.3. Indução da Asma Experimental resistente a glicocorticoide

Os animais dos grupos II e III foram imunizados no dia 1 com uma solução de ovoalbumina em PBS (OVA grau V, 20 µg, sc) emulsionada com adjuvante de Freud (AF, 75 µl). Nos dias 21 e 22 os animais foram expostos ao desafio inalatório com uma solução de OVA (grau III) a 1%. Logo em seguida ao desafio inalatório, os animais dos grupos III foram tratados intraperitonealmente com dexametasona (Sigma-Aldrich, St Louis , Mo) ou PBS. Após 24 h da última inalação as análises foram realizadas.

O desafio inalatório foi realizado através do sistema gerador de gás, o qual apresenta fluxo contínuo para evitar problemas secundários a hipóxia ou interferências pela amônia ou excesso de umidade. Para isto, foram realizados dois orifícios em lados opostos na câmara de vidro padrão (20 L), um para entrada e outro para saída dos gases, e o fluxo contínuo será garantido através de um nebulizador ultrassônico que produz um aerossol com partículas entre 0,5 e 1 micron (Lino dos Santos Franco et al, 2006).

3.4. Eutanásia

Após 24h da última inalação foi realizada a eutanásia para coleta dos materiais.

Os animais foram pesados e realizadas sedação e analgesia por hiperdosagem dos anestésicos Cetamina (270 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (30 mg/kg), até completa perda de sensibilidade.

Logo após a eutanásia com a completa exsanguinação dos animais, foram realizadas as canulações das traqueias para a coleta do LBA (De Lima et al;.1992) e em seguida removidos ambos os pulmões de todos os grupos. Todos foram armazenados de acordo com a análise que foi realizada.

3.5. Quantificação total das células do lavado broncoalveolar (LBA)

Para determinar o número de células recrutadas no espaço alveolar, as traqueias dos animais foram canuladas com jelco nº 22, após completa exsanguinação, e o espaço alveolar foi lavado com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e retirado o lavado.

O LBA foi recolhido em tubo Falcon e centrifugado a 1500 RPM durante 15 minutos a 20 °C. O sedimento celular resultante foi ressuspenso em 1 ml de PBS e corado com cristal violeta para contagem do número total de células.

Do material ressuspenso com 1 ml de PBS foi retirado uma alíquota de 90 µl e adicionado 10 µl de corante cristal violeta. Em seguida, retiramos 10 µl dessa solução e diluiremos em 90 µl de PBS. Essa rediluição tem a finalidade de termos uma quantidade de 10⁵ células/ml.

Esse material foi então analisado microscopicamente e realizada contagem total das células na câmara de Neubauer.

3.6. Análise histológica dos pulmões dos animais

Imediatamente após retirada do LBA, fragmentos pulmonares foram retirados e colocados em tubo de eppendorf com 1 ml de formol 10% por 24h. Após esse período, os fragmentos foram desidratados em álcool 70%.

Os fragmentos foram embebidos em parafina, desparafinados e seccionados a 5 µm (micrótomo HYRAX M60, Zeiss, GR). Em seguida os tecidos foram corados com os diferentes corantes de acordo com a finalidade da análise, sendo:

- Hematoxilina – Eosina (HE): análise da migração celular
- Ácido Periódico-Schiff (PAS): análise do muco
- Azul toluidina: análise da desgranulação mastocitária

Os corantes artificiais são sais que podem ser ácidos, como a eosina, se tiverem cargas negativas, sendo conhecidos como aniônicos e/ou também como corantes citoplasmáticos, pois coram o grupamento químico, eletricamente carregado, localizado em uma extremidade da cadeia de aminoácidos que compõem as proteínas citoplasmáticas. As substâncias que são atraídas pelos corantes ácidos são chamadas acidófilas e tem um perfil básico ou alcalino. Os básicos como o azul de

metileno, azul de toluidina e a hematoxilina, possuem uma carga elétrica positiva, portanto são catiônicos e colorem os núcleos, uma vez que tem afinidade pelos ácidos nucleicos (DNA e RNA). As substâncias que são atraídas pelos corantes básicos são chamadas basofílicas e são constituídas por ácidos. (Timm, Lilian de L. 2005; Gartner e Hiatt, 1999). O azul de toluidina, devido a metacromasia, ou seja, sua capacidade de corar o núcleo com diferentes tons da mesma cor, é importante na avaliação da desgranulação mastocitária. (Sridharan G, Shankar AA, 2012)

A coloração PAS é usada para a detecção de estruturas que contêm muita quantidade de carboidratos, como glicogênio, glicoproteína, proteoglicano que são encontrados no muco e tecido conjuntivo. (Hauber, H.P; Zabel, P, 2009)

3.7. Análise estatística

As comparações entre os grupos experimentais serão realizadas através do ANOVA one-way, seguido pelo teste Student's Newman-Keuls para comparações múltiplas utilizando o software GraphPad V.5. Os dados foram expressos em médias +- EPM. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento com dexametasona na análise do lavado broncoalveolar do pulmão de filhotes de ratos com asma experimental

A análise da celularidade total e diferencial do lavado broncoalveolar foi avaliada no dia 23 do experimento, após a indução da asma por exposição a ovalbumina por três dias consecutivos, e tratamento com dexametasona no grupo correspondente.

Os resultados mostraram que o tratamento com dexametasona causou um aumento das células totais assim como mononucleares que foi significativamente diferente quando comparado ao grupo controle e com o grupo OVA. O tratamento com dexametasona causou um aumento de células polimorfonucleares que foi diferente do controle, mas não houve diferença em relação ao grupo que recebeu somente o tratamento com OVA (figura 2).

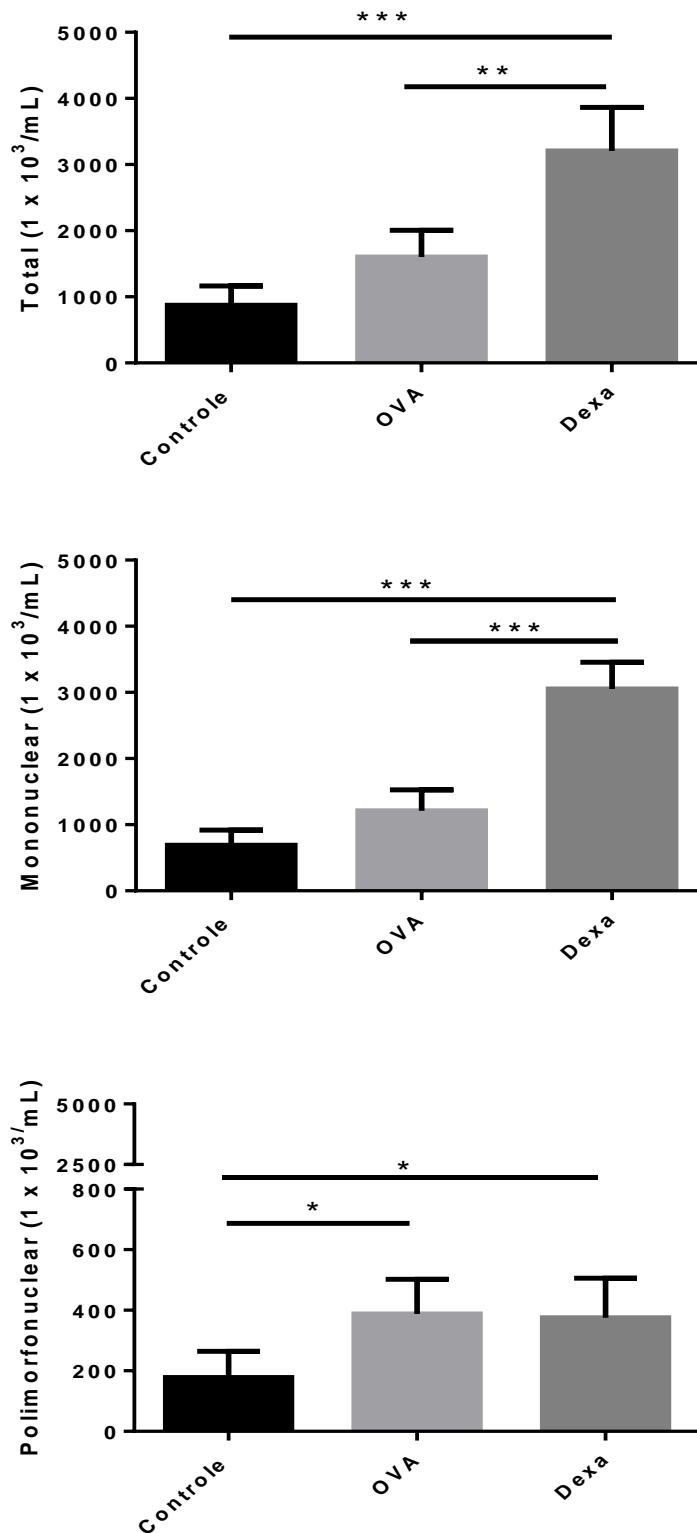


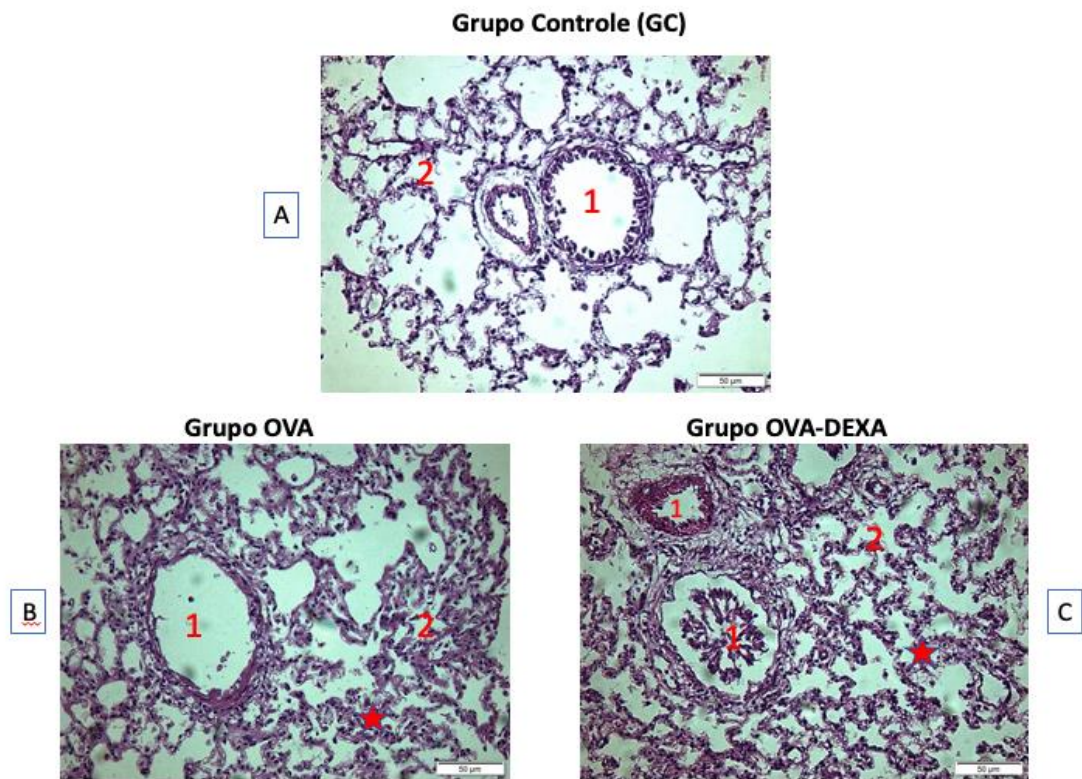
Figura 2 – Células inflamatórias em pulmão de filhotes de ratos em resposta a exposição de OVA e tratamento com dexametasona. Contagem total e diferencial foram obtidos em animais após a indução da asma e tratamento com dexametasona. Os leucócitos foram coletados e realizada as contagens total e diferencial das células. Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2. Efeito do tratamento com Dexametasona no corte histológico em pulmão de filhotes de ratos com asma experimental corados com HE

Em (a) temos lâmina histológica em que veem pulmões de animais controle mostrando arquitetura normal de pulmão, sendo em 1 bronquíolo terminal com estruturas preservadas e sem aumento de celularidade, ao passo que em 2 temos alvéolos com sua morfologia íntegra. Em B temos corte histológico de pulmões de animais tratados com OVA por 3 dias consecutivos, no qual se percebe aumento considerável de células inflamatórias, predominantemente mononucleares e um espessamento na arquitetura alveolar. Em C temos lâmina histológica de pulmões de animais tratados com ovalbumina por 3 dias, seguida por tratamento com dexametasona, que apresenta maior número de células inflamatórias quando comparados aos grupos OVA e controle (Figura 3.A).

Em (b) a análise quantitativa de células inflamatórias nas lâminas histológicas de pulmão de filhote de rato Wistar com asma experimental demonstrou um aumento de celularidade total no grupo OVA e no grupo tratado com dexametasona em relação ao grupo controle. O tratamento com dexametasona causou um aumento de células inflamatórias no tecido pulmonar que foi diferente do controle, mas houve pouca diferença em relação ao grupo que recebeu somente o tratamento com OVA (Figura 3.B).

a)



b)

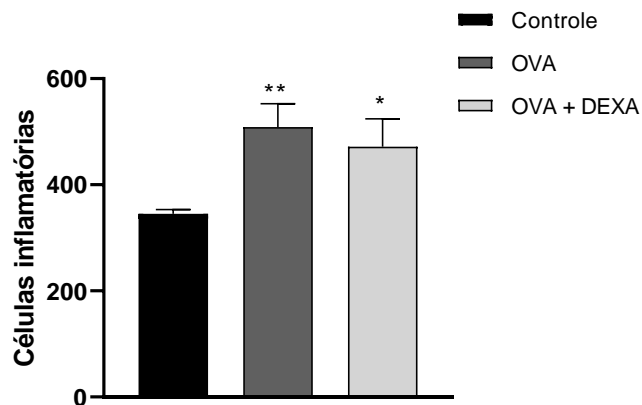


Figura 3 - Cortes histológicos de pulmão de filhote de rato Wistar em aumento de 20x, corados por HE. (a) Em 1 observa-se um bronquíolo terminal; em 2 observam-se alvéolos pulmonares. Nota-se evidente aumento de celularidade em B e C (estrela), bem como aumento da camada muscular dos bronquíolos terminais quando comparados ao grupo A. **(b)** Análise quantitativa das células inflamatórias totais no corte histológico de pulmão de filhote de rato Wistar corados por HE. Os dados representam a média ± EPM de 4 animais por grupo (ANOVA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.3. Efeito do tratamento com dexametasona na transmigração mastocitária em pulmão de filhotes de ratos com asma experimental corados com Azul de Toluidina

Em A temos lâmina histológica mostrando pulmões de animais controle explicitando arquitetura normal de pulmão, sendo 1 bronquíolo terminal com estruturas preservadas e sem aumento de celularidade; em 2 apresentamos alvéolos com sua morfologia íntegra. Em B temos corte histológico de pulmões de animais tratados com OVA por 3 dias consecutivos, onde fica claro o aumento considerável de células inflamatórias, predominantemente mononucleares e um espessamento na arquitetura alveolar. Em C temos lâmina histológica de pulmões de animais tratados com ovalbumina por 3 dias, seguida por tratamento com dexametasona, notando celularidade semelhante a mastócitos em todos os grupos marcados por sua metacromasia (Figura 4).

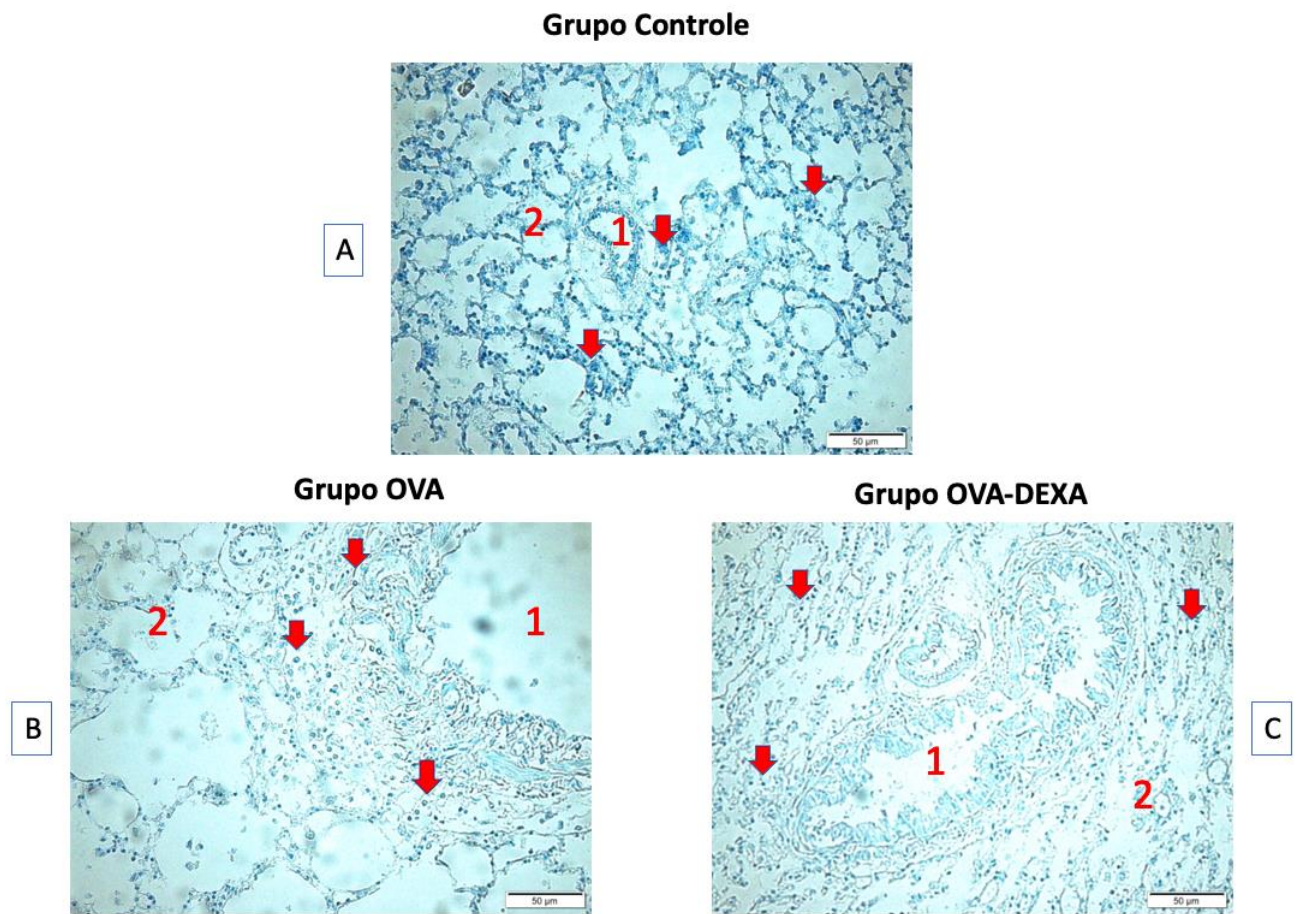


Figura 4 - Cortes histológicos de pulmão de filhote de rato Wistar em aumento de 20x, corados por Azul Toluidina. Em 1 observa-se um bronquíolo terminal; em 2 observam-se alvéolos pulmonares. Observam-se mastócitos marcados por sua metacromasia (seta)

4.4. Efeito do tratamento com dexametasona na produção de muco em pulmão de filhotes de ratos com asma experimental corados com PAS

Em A temos lâmina histológica mostrando pulmões de animais controle mostrando arquitetura normal de pulmão, sendo 1 bronquíolo terminal com estruturas preservadas e sem aumento de celularidade; em 2 apresentamos alvéolos com sua morfologia íntegra. Em B temos corte histológico de pulmões de animais tratados com OVA por 3 dias consecutivos, mostrando aumento considerável de células inflamatórias, predominantemente mononucleares e um espessamento na arquitetura alveolar. Em C temos lamina histológica de pulmões de animais tratados com ovalbumina por 3 dias, seguidos por tratamento com dexametasona, apresentando evidente aumento de muco em B e discreto aumento de muco em C, quando comparados ao grupo controle (Figura 5).

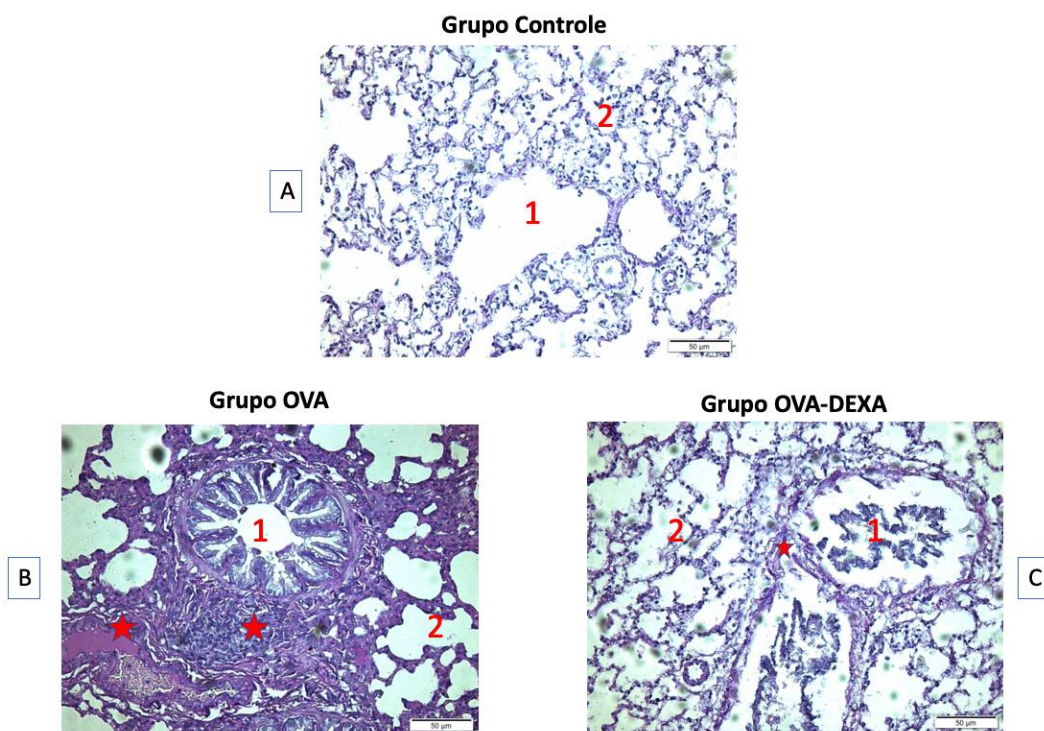


Figura 5 - Cortes histológicos de pulmão de filhote de rato Wistar em aumento de 20x, corados por PAS. Em 1 observa-se um bronquíolo terminal; em 2 observam-se alvéolos pulmonares. Observa-se maior quantidade de muco no grupo B quando comparado a A e C (estrela).

5. DISCUSSÃO

A asma é uma doença inflamatória causada por diversas reações alérgicas de hipersensibilidade imediata e tardia no pulmão que conduzem a tríade clínica e histopatológica de obstrução intermitente e reversível das vias aéreas, inflamação crônica dos brônquios com células inflamatórias, e hipertrofia das células do músculo liso e hiperreatividade brônquica. Grande parte das publicações concorda que os principais sintomas da asma são: sibilos, falta de ar, aperto no peito e tosse, predominantemente a noite e pela manhã. Embora na maioria dos casos a doença possa ser controlada com o uso de corticosteroides, que bloqueiam a produção das citocinas inflamatórias, e do antagonista adrenérgico (β_2) que atuam causando broncodilatação a curto ou longo prazo, existe um percentual de pacientes (entre 5 e 10%) que apresentam uma resposta insatisfatória ao tratamento convencional, tornando-se refratários às terapias que dão resultados em outros indivíduos. (NASCIMENTO, Eduardo Castelã, 2020; Reddel, H et al, 2021).

Segundo um estudo transversal para descrever as características clínicas e identificar fatores associados à gravidade da asma, os corticoides inalatórios mais utilizados no tratamento dessa infecção respiratória são beclometasona (88%) e budesonida (69%), os quais apresentaram adesão da maioria dos pacientes (77%) contra apenas alguns poucos não aderentes (6%). Além disso, este mesmo estudo ainda associou à asma refratária sintomas de doença do refluxo gastroesofágico e contagem de eosinófilos > 260 células/mm². (Alves et al, 2020) portanto sempre é importante descartar outras patologias causadores de tosse crônica, uso de medicamentos associados que possam acelerar a depuração dos glicocorticoides e até mesmo a má adesão ao tratamento antes de se chegar ao diagnóstico da asma de difícil controle (LEUNG, Donald YM; SZEFLER, Stanley J, 1997).

Nosso estudo demonstrou um aumento de células inflamatórias no pulmão de filhotes de ratos tanto em animais que foram desafiados com OVA quanto os desafiados com OVA + dexametasona, demonstrando um perfil inflamatório nesses animais. Neste sentido, asma é histologicamente caracterizada por hiperplasia de células caliciformes, infiltração de células inflamatórias da mucosa brônquica, espessamento da submucosa e descamação de células epiteliais (Liang et al., 2017).

É fato que diversos estudos têm demonstrado que o desenvolvimento da hipersensibilidade imediata a exposição de um antígeno se dá pelo estímulo aos linfócitos Th2 que desencadeiam citocinas que atuam produzindo IgE e uma vez ativado, quando exposto novamente, ocorre então uma fase de hipersensibilidade tardia, onde o IgE se liga a receptores de alta afinidade expressos em mastócitos e basófilos e induzem a degranulação mastocitária e desencadeamento de toda cascata inflamatória da asma (Harris et al, 1995; Galli et al., 2005; Mota Pinto e Todo-Bom, 2009) causando então os sintomas da fase tardia como obstrução brônquica, persistência dos sibilos e remodelamento pulmonar (Homma et al, 2005). Sendo assim, vários estudos mostram que o receptor de IL-4 e as citocinas IL-4 e IL-13 desempenham relevante papel na patologia da asma e que os monócitos/macrófagos podem adquirir um fenótipo ativado por via alternativa quando estimulados pelas citocinas Th2, IL-5 e IL-13, que promovem a expressão da enzima arginase, marcador clássico de macrófagos ativados alternativamente em células de camundongos, cuja expressão em monócitos/macrófagos ainda não esteja claramente definida. (FERNANDES, 2017).

Fenotipicamente, o perfil dos linfócitos dos indivíduos com asma também foi estudado no supracitado estudo, no qual se afirma ainda que é necessário compreender as questões adjacentes ao entendimento do perfil imunológico dos indivíduos asmáticos refratários, como a avaliação de moléculas associadas à coestimulação e regulação do perfil do perfil Th2, Th1 e Th17, imprescindíveis para futuras estratégias de prevenção, evitando uma evolução na gravidade da doença (FERNANDES, 2017).

Análogo à maioria das publicações consultadas, nosso estudo também pode inferir que as subpopulações de monócitos dos pacientes com asma induzida refratária a glicocorticoides têm papel muito importante no decurso da doença, uma vez que também apresenta distintos perfis associados com a produção de citocinas e expressão de receptores na resposta imune envolvendo Th2 e no remodelamento dos tecidos. Além do mais, a análise histológica dos pulmões das cobaias com asma refratária permitiu-nos constatar que a refratariedade ao tratamento de alguns pacientes com asma se deve a uma diminuição de regulação dessas células impactadas pela inflamação, ao passo que a gravidade da doença se relaciona a um aumento das citocinas Th1 e Th17, assim como resultados obtidos também por outros

estudiosos. Além dos monócitos e linfócitos, sabe-se que outra célula importante na hiperresponsividade induzida por antígeno são os mastócitos. Ao serem ativados liberam mediadores inflamatórios associados a inflamação propriamente dita, bem como a contração do músculo liso pulmonar (Galli et al., 2005).

Os mastócitos são os principais responsáveis pela resposta asmática por meio da secreção de uma infinidade de mediadores com efeitos pró-inflamatórios e constritivos das vias aéreas. Mediadores de mastócitos bem conhecidos, como histamina e lipídios bioativos, são responsáveis por muitos dos efeitos fisiológicos observados na fase aguda das reações alérgicas (Méndez-Enríquez et al., 2019). Nossos resultados demonstraram a presença de mastócitos em filhotes que foram tratados com dexametasona, podendo se uma das células responsáveis pela gravidade da resposta dos pacientes que não respondem a terapia com glicocorticoides.

Sendo assim, nosso trabalho demonstrou, através da análise do LBA e da histologia dos pulmões de filhotes de rato Wistar aumento significativo de células, predominantemente mononucleares nos animais tratados com OVA e com dexametasona. Houve um aumento de polimorfonucleares no grupo tratado com dexametasona em relação ao controle, porém não houve aumento em relação ao grupo exposto a ovalbumina.

Apurou-se ainda aumento de muco no grupo OVA, apesar do pouco aumento no grupo tratado com dexametasona, que sugere uma efetividade no controle do processo inflamatório. Entretanto na análise histológica notou-se significativo aumento de celularidade total nos pulmões dos animais expostos a ovalbumina em relação ao controle, e pequena diferença de celularidade entre o grupo ovalbumina e o grupo tratado com dexametasona. Além disso, houve pouca diferença de transmigração mastocitária entre os grupos, que pode sugerir uma provável ativação de outra via diferente da típica Th2. Assim como verificado em estudos análogos, a gravidade da asma tem relação com aumento das citocinas do perfil Th1 e Th17 pelos linfócitos, enquanto a refratariedade terapêutica está diretamente associada a uma diminuição de regulação dessas células, embora mais estudos sejam necessários para que possamos entender com mais clareza o perfil imunológico dos indivíduos impactados pela asma refratária a glicocorticoides.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que no modelo de asma experimental induzida por OVA, o tratamento com dexametasona diminui muco em pulmão de filhotes de ratos, mas apresenta aumento das células inflamatórias causando a refratariedade e gravidade da doença.

REFERÊNCIAS

Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltsev N, Lenfant C, O'byrne P, Sheffer A. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy*, 62:102-12, 2007.

CORRIGAN, C. J. ; BROWN, P. H. ; BARNES, N.C.; SZEFLER, S.J.; TSAI, J.J.; FREW, A.J.; KAY, A. B. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics, and inhibition of peripheral blood T cell proliferation by glucocorticoids in vitro. *Am Rev Respir Dis.*; 144:1016–25, 1991.

DE LIMA, W.T.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. *Eur. J. Pharmacol.*, 63–70, 2013.

Ernst P, Suissa S. Systemic effects of inhaled corticosteroids. *Curr Opin Pulm Med*, jan;18 (1): 85-9, 2012.

FILHO, P.D.T. Asma Brônquica. Disponível em http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tratamento_asma_asma_esteroide_resistente.html[30/04/ 22: 48:05], 2021.

FLÓ-NEYRET, C.; LORENZI-FILHO, G.; MACCHIONE, M.; GARCIA, M.L.; SALDIVA, P.H. Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Braz J Med Biol Res.* May;34(5):639-43, 2001.

FRANCO, A.L. dos S. et al. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 35–42; 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA) - Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma, 2018.

HAUBER, H.P.; ZABEL, P. PAS staining of bronchoalveolar lavage cells for differential diagnosis of interstitial lung disease. *Diagnostic Pathology*, 4:13, 2009.

He, Y et al. Development of highly potent glucocorticoids for steroid-resistant severe asthma. *PNAS*. v. 116; n14: 6932-6937. 2019.

Homma T, Bates JH, Irvin CG. Airway hyperresponsiveness induced by cationic proteins in vivo: Site of action. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289:413-418, 2005.

IV diretriz brasileira de manejo da asma. J Bras Pneumologia. n32(Supl 7):S 447-S 474. 2006.

LANG, I.; BRUCKNER, T.; TRIEBIG, G. Formaldehyde and chemosensory irritation in humans: a controlled human exposure study. Regul Toxicol Pharmacol. Feb;50(1):23-36. 2008.

LEUNG, D.Y.; BLOOM, J.W. Update on glucocorticoid action and resistance. J Allergy Clin Immunol.;111:3–22, 2003.

LEUNG, D.Y.M.; SZEFLER, S. J. Diagnosis and management of steroid-resistant asthma. Clinics in chest medicine, v. 18, n. 3, p. 611-625, 1997.

LIANG P, PENG S, ZHANG M, MA Y, ZHEN X, LI H. Huai Qi Huang corrects the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in an ovalbumin-induced asthma mouse model. Biosci Rep. 2017 Dec 22;37(6):BSR20171071

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO et al. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde- exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. Toxicol. Appl. Pharmacol., v, 214, 35–42, 2006.

MATSUMURA, Y. Heterogeneity of glucocorticoid resistance in patients with bronchial asthma. Int J Biomed Sci, 2010.

MATTHEWS, J. G.; ITO, K.; BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. J Allergy Clin Immunol.;113:1100, 2004.

NAOUM, P.C. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP www.ciencianews.com.br Novembro ,2009.

MÉNDEZ-ENRÍQUEZ E, HALLGREN J. Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. Front Immunol. 2019 May 29;10:821.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R, SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. Revista Brasileira de Anestesiologia Vol. 61, N. 2, Marco-Abril, 2011.

Platts-Mills TA. The allergy epidemics: 1870-2010. J Allergy Clin Immunol. Jul;136(1):3-13, 2015.

POON, A.H. et al. Pathogenesis of severe asthma. Clinical e Experimental Allergy; 42, 625–637, 2012.

RAED, L et al. Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, Vol. 62(10) 751–758, 2014.

REDDEL, H. et al. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available at: <http://www.ginasthma.org>. 2021.

REIMBERG, M.M.; PACHI, J.R.S.; SCALCO, R.S.; SERRA, A.J.; FERNANDES, L.; POLITTI, F.; et al. Patients with asthma have reduced functional capacity and sedentary behavior. *J Pediatr (Rio J)*, 2018.

RIBAS, C. R. et al. Citologia de lavado broncoalveolar de cães: comparação entre lâminas a fresco e conservadas em formol. *Archives of Veterinary Science*, [S.l.], v. 15, n. 2, nov.. ISSN 2317-6822, 2010.

SALTHAMMER, T.; MENTESE, S.; MARUTZKY, R. Formaldehyde in the indoor environment. *Chem Rev*. Apr 14;110(4):2536-72, 2010.

Souza-Machado C, Souza-Machado A, Franco R, Ponte EV, Barreto ML, Rodrigues LC, et al. Rapid reduction in hospitalisations after an intervention to manage severe asthma. *Eur Respir J*, 35 (3): 515-21, 2010.

SPAHN, J.D.; SZEFLER, S.J.; SURS, W.; DOHERTY, D.E.; Nimmagadda, S.R.; Leung, D.Y. A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *J Immunol*.;157:2654–9, 1996.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A.A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*;16:251-255, 2012.

SZEFLER, S.J.; LEUNG, D.Y. Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Respir J*.;10:1640–7, 1997.

TIMM, L.de L. *Caderno La Salle XI, Canoas*, v.2, no 1, 231 – 239, 2005.

VERGANI, K.P. *Asma grave em crianças e adolescentes: Análise da variação fenotípica e fatores relacionados ao não controle clínico*. Dissertação, Faculdade de Medicina da USP, 2017.

VOS, T.; FLAXMAN, A.D.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; MICHAUD, C.; EZZAT, I. M. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*.;380: 2163-96, 2012.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da exposição ao formaldeído em asma experimental resistente a glicocorticoide em filhotes de ratos", protocolada sob o CEUA nº 4467110619 (ID 000166), sob a responsabilidade de **Stella Regina Zamuner** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 20/08/2019.

We certify that the proposal "Effects of exposure to formaldehyde in experimental glucocorticoid-resistant asthma in offspring rats", utilizing 90 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 4467110619 (ID 000166), under the responsibility of **Stella Regina Zamuner** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 08/20/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **08/2021** Área: **Medicina**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 30 dias**

N: **90**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **15 a 20 g**

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa da Universidade Nove de Julho -Vergueiro

São Paulo, 03 de maio de 2021

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho