

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Paulo Silva**

**INFLUÊNCIA DO FUROSEMIDE UTILIZADO POR VIA  
SISTÊMICA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR EM  
CAMUNDONGOS BALB/C EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO  
ANTIGÊNICA COM OVALBUMINA.**

**PORTO ALEGRE -2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PNEUMOLOGIA

**INFLUÊNCIA DO FUROSEMIDE UTILIZADO POR VIA  
SISTÊMICA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR EM  
CAMUNDONGOS BALB/C EM RESPOSTA A ESTIMULAÇÃO  
ANTIGÊNICA COM OVALBUMINA.**

**Dissertação de Mestrado**

**Paulo Silva**

Orientadores: **Dr. Bruno Palombini**

**Dr. Jorge Lima Hetzel**

Co-orientador: **Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez**

**PORTO ALEGRE -2003**

S586i Silva, Paulo  
Influência do furosemide utilizado por via sistêmica na resposta  
inflamatória pulmonar em camundongos BALB/C em resposta a  
estimulação antigênica com ovalbumina / Paulo Silva. – 2003.  
88 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação  
em Pneumologia, 2003.

Orientadores: Dr. Bruno Palombini; Dr. Jorge Lima Hetzel;  
co-orientador: Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

1. Pneumologia. 2. Asma – Tratamento. 3. Furosemida. 4.  
Ovalbumina. I. Palombini, Bruno. II. Hetzel, Jorge Lima.  
III. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. IV. Título.

CDU 616.248

*A minha esposa Ivete, pelo carinho, companheirismo,  
compreensão e estímulo durante toda esta longa jornada.*

*Ao meu querido **pai**, pelo esforço em minha formação e pelo grande exemplo de caráter e alegria de vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família

Ao Paulo Pitrez pela amizade, paciência, desprendimento e principalmente pelas preciosas orientações técnicas sem as quais, não teria sido possível o desenvolvimento desta tese

Ao Dr Jorge Hetzel e Dr Moreira, pelas importantes orientações e pela sempre amiga e estimulante convivência ao longo do desenvolvimento desta tese

Ao Marco Aurélio Silva da Pós-Graduação – Pneumologia, pelo respeito, paciência e sempre prestimosa ajuda

Ao Dr Leonardo Pinto da equipe de Residentes em Pneumologia Pediátrica da PUC pela desprendida ajuda ao longo desta tese

Ao grupo de pesquisa do Instituto de Pesquisas da PUC pelo apoio e colaboração em especial a Bióloga Ana Cristina de Oliveira Dias

A Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro para a realização da Tese

A gerência de Informática do GHC pela inestimável cooperação na formatação da Tese

## LISTA DE ABREVIATURAS

**VA** = via aérea

**TNF- $\alpha$**  = fator de necrose tumoral-alfa

**IL** = interleucina

**OVA** = ovalbumina

**RN** = recém-nascido

**ICAM** = Moléculas de Adesão Celular Intercelular

**VCMA** = Molécula de Adesão Celular Vascular

**MBP** = Major Basic Protein

**ECP** = Eosinophilic Cationic Protein

**EDN** = Eosinophil-derived neurotoxin

**EPO** = Eosinophil Peroxidase

**OVA** = Ovalbumina

**IP** = Injeção Intra-Peritoneal de OVA

**IN** = Instilação Intra-Nasal de OVA

**Fur** = Grupo de estudo com Furosemida

**GCo** = Grupo Controle

**LBA** = Lavado Bronco-Alveolar

**PUCRS** = Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**GM-CSF** = Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

## ANEXOS

### **Anexo 1**

**Gráfico 1** Níveis de Interleucina-10 no lavado bronco-alveolar .....82

### **Anexo II**

**Gráfico 2** Níveis de Interferon-gama no lavado bronco-alveolar..... 83

**Gráfico 3** Níveis de Interleucina-6 no lavado bronco-alveolar ..... 83

### **Anexo III**

**Gráfico 4** Contagem total de células ..... 84



## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig 1</b> A circulação pulmonar .....	V
<b>Fig 2</b> A Microcirculação brônquica .....	VI
<b>Fig 3</b> Aporte de células aos tecidos .....	VII

## RESUMO

O processo inflamatório final na asma necessita da interação e ação de três setores do nosso organismo: a medula óssea, local de produção das células inflamatórias, a circulação brônquica local de passagem dessas células e os tecidos, o órgão final de sua ação – todos igualmente importantes. Dos três, o compartimento tecidual é o mais extensivamente estudado e o circulatório o menos, com nenhuma citação em pesquisa Cochrane nos últimos 20 anos. Buscando escrutinar o real valor deste último no processo asmático e vislumbrando a possibilidade de interferência terapêutica a este nível, utilizou-se um protocolo animal que mimetiza os acontecimentos da asma – camundongos BALB-C sensibilizados e posteriormente desafiados antigênicamente com OVA (Ovalbumina) - submetidos a ação de uma droga que sabidamente atua sobre o fluxos sanguíneos, o furosemide, um diurético de alça, com funções bem definidas sobre a dinâmica vascular em outras situações patológicas que não asma. O Objetivo do trabalho foi, verificar se essa ação vascular não diurética, poderia influenciar o aporte celular (eosinófilos, neutrófilos) e interleucinas (6, 10, TNF- $\alpha$ ) pesquisados no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais de estudo. A análise do LBA mostrou não haverem diferenças entre os conteúdos celulares e de interleucinas entre os grupos de estudo com furosemide e o grupo controle. Concluiu-se pela não atuação do furosemide usado por via sistêmica sobre os níveis de interleucinas e na contagem total de células no modelo utilizado. Sugere-se a continuação das pesquisas envolvendo o compartimento circulatório uma vez que existem inúmeras evidências indiretas da sua importância que uma vez comprovado, abriria uma nova janela terapêutica para o tratamento da asma ao impedir que mais células inflamatórias aportem aos tecidos da via aérea quando de uma agressão a este órgão.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Conceito asma .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Conceito geral de inflamação .....</b>	<b>12</b>
<b>2. O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA ASMA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Evidências da inflamação brônquica na asma .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 A produção de células inflamatórias pela medula óssea – Os         progenitores celulares .....</b>	<b>14</b> <b>15</b>
<b>2.3 As células inflamatórias .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1 Eosinófilos .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2 Neutrófilos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 A Participação das Interleucinas .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1 Conceito .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.2 Interleucina 6 (IL-6) .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.3 Interleucina 10 ( IL-10 ) .....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.4 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF <math>\alpha</math> ) .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Contribuição da circulação pulmonar para o processo         inflamatório na asma .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Contribuição do extravasamento da circulação para o processo         inflamatório na asma .....</b>	<b>23</b>
<b>3. FORMAS DE INTERFERÊNCIA EXTERNA SOBRE O PROCESSO</b>	

<b>INFLAMATÓRIO NA ASMA</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Formas conhecidas de interferência</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Utilização dos diuréticos em asma</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Utilização do furosemide em asma</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4 Efeitos do furosemide na circulação pulmonar</b> .....	<b>28</b>
<b>4. UTILIZAÇÃO DE MODELO ANIMAL PARA ESTUDAR O</b> <b>PROCESSO INFLAMATÓRIO NA ASMA</b> .....	<b>31</b>
<b>5. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>7. MATERIAL/MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>7.1 Animais do estudo</b> .....	<b>36</b>
<b>7.2 Sensibilização com OVA</b> .....	<b>36</b>
<b>7.3 Broncoprovocação com OVA</b> .....	<b>37</b>
<b>7.4 Intervenção com furosemide</b> .....	<b>40</b>
<b>7.5 Lavado Broncoalveolar</b> .....	<b>40</b>
<b>7.6 Contagem total de células</b> .....	<b>41</b>
<b>7.7 Análise das Citocinas</b> .....	<b>41</b>
<b>7.8 Fluxograma contagem diferencial de células</b> .....	
<b>8. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>44</b>
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>9.1 Contagem de Células</b> .....	<b>45</b>

9.2	Análise da celularidade total e de interleucinos no líquido do	
	LBA .....	45
10.	DISCUSSÃO .....	48
11.	CONCLUSÃO .....	53
12.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	54
12.1	Necessidade de continuar a pesquisa .....	54
12.2	Importância do componente vascular no processo asmático .....	55
12.3	Implicação da interferência terapêutica no componente vascular para o tratamento da asma .....	57
13.	REFERÊNCIAS .....	60

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Conceito de Asma**

Várias definições para asma têm sido propostas desde 1959 a partir do simpósio “Ciba Foundation” (Ciba Guest Symposium, 1959). Segundo a edição do “II Global Strategy for Asthma Management and Prevention Report”, a asma é uma doença inflamatória crônica da via aérea (VA), na qual vários tipos celulares desempenham um papel importante, tais como mastócitos e eosinófilos (Who/NHLBI Workshop Report, 1995; Synek M e col., 1996; Hamid Q e col., 1997; Djukanovic, 2000).

## **1.2 Conceito geral de Inflamação**

A frase “rubor e edema, com calor e dor” é atribuída a Cornelius Celsus, no século I A.D. (Ryan GB e Majano G, 1977). Rudolf Virchow, no século XIX, modificou esta descrição clínica inicial incluindo o termo *functio laesa*, ou “distúrbio de função”, com suas observações de que os tecidos inflamados não funcionavam normalmente. Entretanto, é creditada Julius Conhein, um estudante de Virchow, a observação de que a inflamação também inclui exudação e extravasamento de leucócitos locais para os tecidos afetados. Esses conceitos ainda continuam sendo verdadeiros para a definição do processo inflamatório, que devem incluir o fenômeno de mudança de diâmetro e de fluxo sanguíneo na vasculatura local, associado com um aumento da permeabilidade e infiltração leucocitária. (Bochmer BS, 2000).

## **2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA ASMA**

### **2.1 Evidências da Inflamação Brônquica na Asma**

As evidências da inflamação brônquica na asma surgiram a partir de estudos sobre hiper-responsividade brônquica inespecífica, com dados de lavado broncoalveolar (Godard P, 1982), biópsia brônquica (Jeffery P, 1996), escarro induzido (Maestrelli P, 1995; Howarth P, 1998) e de observações *pós-mortem* (Ellis A, 1980). Nas vias aéreas de pacientes com asma, várias células podem ser identificadas interagindo com o ambiente. Além de linfócitos e fagócitos mononucleares, tanto mastócitos como o epitélio das vias aéreas, podem liberar substâncias que alteram a estrutura da VA em resposta a um estímulo ambiental externo. Alguns produtos destas células sentinelas (mediadores e citocinas) atraem células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e fagócitos mononucleares) para dentro da luz e da parede da VA. Essas células infiltradas também liberam por sua vez, produtos que afetam a estrutura da VA. Musculatura lisa, vasos, elementos neurais e o epitélio da VA podem sofrer danos por este processo inflamatório. A parede da VA se espessa devido a vários fatores que incluem o acúmulo de fluido e de células dentro da parede e a hipertrofia da musculatura lisa (Larsen GL,2000). Muitas dessas células e seus produtos contribuem de alguma forma ao fenótipo da asma, mas o foco primário de investigações recentes tem recaído sobre sub-tipos de linfócitos e seus produtos, incluindo uma complexa rede

de citocinas que parece ser responsável pela manutenção do processo crônico de inflamação na asma (Barnes PJ, 1994; Humbert M e col., 1997; Shi HZ e col., 1998).

Recentemente, tem havido um aumento do interesse nas possíveis diferenças de intensidade desse processo inflamatório em diferentes locais da VA. Alguns autores sugerem que ele seja mais intenso na pequena VA do que na via de maior calibre (Kraft MR e col., 1996). Outros, no entanto, não conseguiram demonstrar tal evidência. (Carrol N e col., 1997; Foul e col., 1997). Haley e col. (1998) analisaram a distribuição de eosinófilos e outras células, tal como leucócitos (CD45+), na VA de pacientes que morreram por asma, comparando com pacientes que morreram com fibrose cística. Foi demonstrado que, na asma, a resposta inflamatória ocorre ao longo de toda a VA, mas com diferenças entre pequena e grande VA. A infiltração celular foi evidente na porção mais externa da parede da VA. Entretanto, esta ocorreu entre a musculatura e o alvéolo na pequena VA, e entre a musculatura e a membrana basal na grande VA. A inflamação crônica da VA é mediada por eosinófilos e outros leucócitos que, após atingirem o local da inflamação, produzem citocinas pró-inflamatórias que mantêm e prolongam o processo, resultando em grave dano ao epitélio respiratório (Haley KJ, 1998). O epitélio respiratório, por sua vez, é uma fonte significativa de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias na asma (Knobil K e Jacoby DB, 1998; Chung KF e Barnes PF, 1998).

Sob condições fisiológicas, o número de leucócitos “seqüestrados” na microcirculação pulmonar, excede o total de leucócitos circulantes em duas a três vezes



(Deerschuk CM e col., 1987). Os leucócitos circulantes, na luz vascular devem primeiro aderir a uma célula endotelial e então migrar entre células endoteliais, para finalmente se moverem através da matriz extracelular, para executar sua função protetora em um determinado tecido inflamado. A rolagem (“rolling”) de leucócitos é mediada através da expressão de citocinas pró-inflamatórias pela ação de selectinas presentes na superfície do leucócito e no endotélio. A adesão ocorre através da ligação da integrina leucocitária- $\beta 2$  à molécula de adesão intracelular do endotélio (ICAM-1).

## **2.2 Produção de Células Inflamatórias pela Medula Óssea - As Células Progenitoras**

O papel da medula óssea nas doenças alérgicas está sob contínua investigação. Existem evidências crescentes de uma associação entre uma resposta hematopoiética e inflamação induzida por um desafio alérgico (Otsuka H, 1986; Denburg JÁ, 1985).

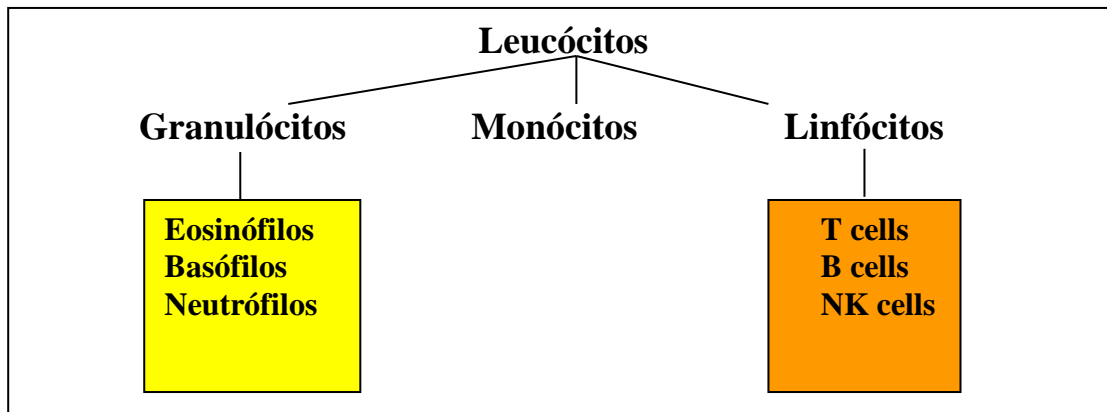
Um outro aspecto importante da resposta inflamatória alérgica, a indução e aumento de células progenitoras que irão contribuir para a doença através da contínua produção de células inflamatórias efetoras. A medula é a principal fonte de eosinófilos, macrófagos e mastócitos. A IL-5 induz diferenciação de eosinófilos imaturos e estimula sua liberação para a circulação, além de prolongar a sua sobrevivência.

A importância da medula óssea na resposta induzida por alérgenos, é sustentada por dois importantes trabalhos que utilizaram o modelo animal sensibilizado com ovalbumina (OVA) e humanos submetidos à provocação pela inalação de alérgenos. Ohkawara Y e col. (1997), trabalhando com camundongos sensibilizados com OVA, identificaram que o pico de eosinofilia ocorre no 3º dia após a exposição alérgica, persistindo por até 15 dias. Inman e col. (1999), também estudando o modelo de camundongos sensibilizados com OVA, demonstraram um aumento dos eosinófilos na VA. Estudos em humanos mostraram que indivíduos atópicos, após desafio com inalação de antígenos, desenvolveram significativa eosinofilia pós-inalação, com aumento na habilidade dos linfócitos T em produzir IL-5 (Wood LJ e col.,2002).

A produção de células inflamatórias é, portanto, mantida pela indução de um número aumentado de células progenitoras inflamatórias na medula óssea.

### **2.3 Células Inflamatórias**

As principais células envolvidas no processo inflamatório são: neutrófilos, eosinófilos e os macrófagos. A diferenciação entre estes e outros grupos celulares se faz através da presença de grânulos em seu interior e por isso sendo denominados de granulócitos (fig 3).



**Fig. 3 - Classificação dos Leucócitos.** Quadro geral dos leucócitos

### 2.3.1 Eosinófilos

Os eosinófilos são consideradas células efetoras e moduladoras do processo inflamatório, produzindo efeitos citotóxicos sobre vários tecidos. Estão associadas não somente ao mecanismo de defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias, mas também envolvidas na fisiopatogenia de doenças alérgicas, imunológicas e neoplásicas. (Kroegel C, 1994). Estas células são originárias de precursores de células hematopoiéticas progenitoras CD34 (+), existentes na medula óssea, onde se desenvolvem, amadurecem e se diferenciam sob controle de um grande número de proteínas, tais como “granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)”,

IL-3 e IL-5. (Clutterbuck EJ e col., 1989; Deburg J A, 1991). Antes de abandonarem a medula óssea, os eosinófilos sofrem um processo de diferenciação e maturação que dura em média 5 dias. Uma vez maduros, deixam então a medula e são lançados no sangue periférico, onde mantém uma vida média de 13-18 horas antes de migrarem aos tecidos, preferindo locais de contato próximos ao ambiente externo, como os tratos gastrointestinal, genito-urinário e respiratório (Spry CFJ, 1988).

O evento inicial na migração dos eosinófilos após a sua rolagem está ligado a aderência desta célula às células endoteliais de vasos sanguíneos próximas do sítio inflamatório, e mediado por Moléculas Celulares de Adesão (CAM) (Fraenkel DJ e col., 1996). Estas células de adesão podem ser agrupadas em três classes: Integreinas, selectinas e Imunoglobulinas (Haskard DO, 1992). As Integrinas são encontradas na superfície dos leucócitos mas não nas células endoteliais sendo consideradas os mediadores primários da adesão entre a célula e a matriz extra-celular e da transmigração endotelial das células inflamatórias (Ruoslahti E, 1991) . Os eosinófilos expressam um grupo dessas moléculas, incluindo as integrinas- $\beta$ 2, LFA-1 e Mac-1. Essas integrinas se ligam com as ICAM-1, moléculas vasculares de adesão-1 (VCAM-1) e selectina-E. A expressão dessas moléculas de adesão está sob o controle de citocinas, e sua indução ocorre sob a influência de IL-1, TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  e IL-4. A rolagem e adesão iniciais dos eosinófilos é o primeiro passo para sua aderência à parede do vaso, após terem ocorrido uma série de eventos celulares. Este mecanismo é mediado em parte pela selectina-L, que se liga de forma fraca e repetitiva na superfície endotelial. São células que contém enzimas e proteínas básicas pré-formadas que são

biologicamente ativas e que estão armazenadas em grânulos citoplasmáticos (Gleich GJ e Adolphson, 1986). Quatro diferentes proteínas catiônicas foram reconhecidas nesses grânulos: a “major basic protein” (MBP), a “eosinophilic cationic protein” (ECP), a “eosinophil-derived neurotoxin” (EDN) e a “eosinophil peroxidase (EPO). A presença de eosinófilos nos tecidos (eosinofilia tecidual), portanto, se deve a combinação de vários processos celulares específicos que aparecem durante os vários estágios do extravasamento dos eosinófilos incluindo: Adesão, Quimiotaxia, Ativação (Knol, 1996).

### **2.3.2 Neutrófilos**

Os neutrófilos são fagócitos polimorfonucleares também originários da medula óssea. São consideradas as células mais importantes da imunidade inata, por seu papel protetor contra infecções bacterianas. Faden e Ogra (1986) sugerem que os neutrófilos também podem exercer um papel importante na defesa anti-viral. Seu papel em asma ainda é sujeito a muita controvérsia. São células que parecem ser residentes normais das vias aéreas de grosso calibre sendo encontrados em números semelhantes em lavado brônquico e em biópsia brônquica de pacientes com asma, bronquite crônica e em controles sadios (Fabbri LM, 1992; Djukanovic R, 1990). Em humanos, a neutrofilia broncoalveolar está presente antes do início e durante as primeiras horas da fase tardia induzida por alérgenos (Meltzer WJ, 1985 ; Diaz P, 1986).

O recrutamento dos leucócitos circulantes até o endotélio vascular, como se vê, é um processo crucial para uma efetiva defesa do indivíduo contra infecção e agressão externa. A inflamação brônquica envolve, portanto, um grande número de células e mecanismos humorais que promovem um aumento na permeabilidade vascular, mudanças no fluxo sanguíneo, mobilização, acúmulo e ativação dos leucócitos, todos mantendo alguma ligação com os eosinófilos durante sua migração aos tecidos (Kroegel C e col., 1994).

## **2.4 A Participação das Interleucinas**

### **2.4.1 Conceito Interleucinas**

Interleucinas foram definidas inicialmente como fatores celulares solúveis produzidos por linfócitos sensibilizados em resposta a um antígeno específico (Dumonde DC e col., 1969). Os termos citocina e interleucina ampliaram posteriormente a definição, incluindo fatores originários de diversos tipos celulares. Várias são as interleucinas relevantes na fisiopatogenia da asma: IL-5, IL-4, IL-3, GM-CSF, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , entre outras.

### **2.4.2 Interleucina 6 (IL-6)**

É uma citocina pleotrópica cujo papel em asma ainda não é totalmente conhecido. Esta interleucina foi originalmente descrita por sua atividade antiviral e por sua ação sobre a estimulação do crescimento de linfócitos B e Plasmocitomas. A IL-6 é secretada por monócitos e macrófagos, pelas células T e células B. Existem evidências que fibroblastos, células endoteliais e epiteliais também produzam esta citocina (Mattoli S, 1991), tendo sido localizada nos grânulos dos eosinófilos (Lacy P, 1998). A IL-6 exerce uma função regulatória em muitas células sendo envolvida na ativação, crescimento e diferenciação das células T, induz também a secreção de várias Imunoglobulinas –pl IgA, IgG, IgM (Akira S, 1993) sendo também um importante co-fator na síntese de IgE (Vercelli D, 1989) Pacientes asmáticos após estimulação antigênica apresentam um aumentado nível de liberação de IL-6 dos macrófagos alveolares (Gosset P, 1992). Foi demonstrado “in vitro” que deflagrantes pendentos da liberação de IgE estimulam a secreção dessa citocina tanto em monócitos sanguíneos como alveolares (Gosset P, 1991). Uma das evidências da relação da IL-6 com a doença viral está em sua presença em níveis elevados em lavados nasais em pacientes, pós infecção por Rinovírus (Zhu Z, 1966).

### **2.4.3 Interleucina 10 (IL-10)**

É uma citocina pleiomórfica produzida por várias células do sistema de defesa, tanto por linfócitos Th0 como linfócitos Th1 e Th2, monócitos e macrófagos ativados. É uma potente citocina inibidora da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos

monócitos/macrófagos (Chung KF e Barnes PF, 1999). A IL-10 também inibe a apresentação de antígenos, tendo seus níveis elevados no sangue quando associada a doenças infecciosas severas. (Lehmann, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que IL-10 regula várias atividades e funções dos neutrófilos como, por exemplo, a inibição e a produção de TNF $\alpha$ . IL-1 e IL-8 por estas células (Cassatela, 1998). Estudos mais recentes, apontam para uma possível relação desta citocina com a doença obstrutiva brônquica viral do lactente (Pitrez PC, 2001).

#### **2.4.4 Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

É uma citocina pró-inflamatória com múltiplas funções, incluindo estimulação da regulação das moléculas de adesão levando a um aumento do acúmulo de leucócitos da circulação ao local de inflamação (Poher JS e col., 1986), aumento da toxicidade e ativação de Monócitos e aumento da citotoxicidade dos eosinófilos (Silberstein DS e David JR, 1986) e co-estimulação e ativação de células T (Greenbaum LA e col. 1988). Estas células, para atingirem os locais onde exercerão suas funções, são transportadas pela corrente circulatória até tais sítios, para então, por diapedese, passam aos tecidos. Em suma, uma ordem complexa de citocinas estão implicadas no controle da síntese de IgE pelas células B. A síntese de IgE é dependente de IL-4, e aumentada pela ação da IL-5 e da IL-6. O Interferon Gama ( IFN $\gamma$  ), a IL-8 e a IL-12 são inibidores da produção de IgE.



O surgimento de citocinas ou quemocinas específicas durante o processo inflamatório, parece ser elemento chave para a liberação de células ativadas aos sítios de inflamação no processo asmático (Busse WW, 1998).

## **2.5 A contribuição da circulação pulmonar para o processo inflamatório na asma**

Os estudos anatômicos da circulação nas vias aéreas têm se preocupado fundamentalmente com o suprimento arterial, a drenagem venosa e suas relações com a circulação pulmonar (McLaughlin RF Jr e Tyler WS, 1966). Grande parte do fluxo sanguíneo, todavia, é direcionada para suprir os tecidos sub-epiteliais - a microcirculação - onde se acredita que desempenhe importante papel de relação com o ambiente, como aquecimento, troca de água e respostas inflamatórias, e participação ativa na absorção de drogas inaladas (Wanner A e col., 1988).

Estudos morfológicos da micro-circulação em várias espécies – ratos, porcos da Índia, cachorros, gatos, macacos e humanos – revelaram a existência de uma extensa rede vascular sub-epitelial (Fig. 1) (Huges T, 1965).

## **2.6 Contribuição de extravasamento da circulação para o processo inflamatório na via aérea na asma**

A contribuição essencial e complexa da micro-circulação é ainda parcialmente compreendida. Na VA sede da inflamação, o processo já está em andamento, a exudação plasmática altera a composição de proteínas, citocinas e mediadores na lâmina própria, na membrana basal do epitélio, no epitélio e na superfície da mucosa. Ocorre um ingurgitamento da mucosa, cuja interpretação mais aceita para a sua instalação é a presença do edema secundário a quantidades elevadas de líquido extravasado. O edema peribrônquico e o edema de mucosa foram descritos na insuficiência cardíaca congestiva, principalmente em brônquios de pequeno calibre (West JB e col., 1964; Don C e Johanson R, 1977).

A microcirculação mais ativa nas doenças da VA é o plexo vênulo-capilar existente na lâmina própria, e que muitas vezes se dirige superficialmente, até penetrar na parte da membrana basal epitelial, exatamente no local onde ocorrem as maiores modificações encontradas na asma (exudação plasmática). A exudação aguda de plasma em resposta a agressões à mucosa da VA envolve uma série de eventos, ocorrendo todos alguns minutos após a agressão. Agentes indutores do aumento da permeabilidade vascular atuam no endotélio venular, que é equipado com uma grande variedade de receptores celulares de superfície. Através da estimulação destes receptores, é perdido o contato célula-célula em diversos pontos da parede das vênulas pós-capilares. Através desses “poros” na parede venular, o plasma é movido pelo gradiente de pressão hidrostática que existe entre as vênulas e o tecido extra-vascular (mais ou menos 20 cm de H<sub>2</sub>O). O extravasamento é um evento dramático, a ponto de abolir localmente o gradiente da pressão coloido-osmótica entre os vasos microscópicos e os tecidos (Persson CGA, 1997).

Estudos de inibição do óxido nítrico, um vasodilatador potente sintetizado e liberado pelas células endoteliais, evidenciou uma diminuição da velocidade das hemácias e um aumento da adesão leucocitária e da permeabilidade de vênulas pós-capilares do mesentério (Wong BM e col., 1997). Taylor e col. (1997), utilizando albumina bovina marcada, demonstraram ocorrer um aumento de 233% no volume sanguíneo, 24 horas após a provocação antigênica da via aérea com OVA. O recrutamento de eosinófilos aos sítios teciduais é um processo de várias etapas, durante as quais estas células devem primeiro vencer as forças de fluxo sanguíneo dentro dos vasos, e, após, utilizando os receptores de adesão se ligarem a receptores similares expressados pelo endotélio vascular, como forma de reduzir sua velocidade realizar a diapedese.

O aumento da permeabilidade vascular e edema da mucosa são também características do processo inflamatório da VA na asma. A patogênese da injúria tecidual é, portanto complexa e não pode ser atribuída a um simples e único fator. Os neutrófilos e eosinófilos circulantes interagem com o endotélio vascular num processo de 3 estágios: o rolar, a adesão e a migração (Xu H e col., 1994).

### **3 FORMAS DE INTERFERÊNCIA EXTERNA SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO NA ASMA**

#### **3.1 Formas conhecidas de interferência – os anti-inflamatórios**

O Tratamento da asma sofreu uma modificação fundamental na última década sendo agora tratada como uma doença inflamatória da via aérea. O reconhecimento desta natureza inflamatória de base, é que levou a introdução dos corticosteróides como anti-inflamatórios e dentre eles, a forma inalada rapidamente ganhou terreno e aceitação como a terapêutica de escolha na asma persistente (National Asthma Expert Panel 1997). Mais recentemente com a descoberta da importância dos leucotrienos na fisiopatogenia do processo asmático, os antagonistas dos Leucotrienos ganharam corpo sendo especialmente úteis para pacientes com asma de difícil controle (Thien F. 2000; Storms W, 2001). Outras alternativas dentro do arsenal terapêutico anti-inflamatório são os imunossupressores como Metotrexate (Shiner,1990) e os bloqueadores dos canais de Cálcio (Hender 1983). A imunoterapia (Des-Roches, 1997) e o controle ambiental (Collof,MJ, 1992) tem igualmente também papel bem estabelecido no tratamento do paciente asmático quando o objetivo for a redução do processo inflamatório na asma.

#### **3.2 Utilização de diuréticos em asma - o furosemide**

Nos últimos anos, tem-se realizado múltiplos estudos mostrando um efeito benéfico do furosemide utilizado por via inalatória em vários tipos de asma, promovendo uma atenuação do broncoespasmo induzido, tanto por estímulos diretos como indiretos. (Bianco S e col., 1988). Este medicamento é capaz de inibir a asma induzida por hiperpnéia em humanos (estímulo direto), atenuando também a resposta brônquica a aspirina, água destilada, solução salina hipertônica e metabisulfite (estímulos indiretos) (Seidenberg J e col., 1992; Vargas FS e col., 1992; Moscato G e col., 1991; (Rodewell LT e col., 1993; Nichol GM e col., 1990) e efeito protetor contra asma induzida por exercício (Pavord ID, 1992), similar ao Sodiocromoglicato (Solé D, 1997). O mecanismo de ação do furosemide inalado, ainda não é bem compreendido, com algumas hipóteses sendo levantadas: inibição de nervos sensoriais da VA, liberação de mediadores dos mastócitos, ação de prostaglandinas broncoconstrictoras, estimulação de prostaglandinas broncodilatadoras ou mesmo vasodilatação local. Das várias ações propostas, suspeita-se que o mecanismo envolvido na resposta asmática esteja relacionado com a inibição do transporte de íons como a nível da alça de Henle, através da entrada do cloro pelo sistema de contra-corrente de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na membrana basolateral das células epiteliais, com redução da secreção de Sódio e Cloro para dentro do Lúmen (Frizzell RA e col., 1979; Welsh MJ, 1983). Poucos estudos experimentais têm analisado um possível efeito antiinflamatório dos diuréticos em asma. Anderson SD e col. (1991) relataram a ação do furosemide inalada inibindo a liberação de mediadores por células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células nervosas. Chin e col. (Chin e col. 1992), estudando o efeito broncodilatador do furosemide sugeriu que poderia haver também uma ação direta desta droga sobre a musculatura lisa.

### 3.3 Efeitos do Furosemide na Circulação Pulmonar

Gilbert e seus colaboradores (Gilbert I e col, 1994) demonstraram que manobras que influenciam o volume vascular, como a expansão com solução salina ou dextran, ou que favoreçam o extravasamento na micro-circulação, podem exercer um forte efeito sobre a função pulmonar. Desde há muito tempo as ações dos diuréticos tem sido bastante estudadas em casos de Infarto do Miocárdio, casos de Edema Pulmonar provocado pela altitude e na Displasia Bronco-pulmonar do recém-nascido. Mais recentemente, estudos relacionados à falência do miocárdio, sugerem estes agentes diuréticos podem melhorar os sintomas, através de um mecanismo extra-renal, antes da ação diurética. Estes medicamentos apresentam efeitos hemodinâmicos e cardiovasculares que foram observados mesmo em casos em que havia um acentuado comprometimento da função renal. (Bathia ML e col., 1969; Biagi RW e Bapat BN, 1967; Davidson RM e col., 1971). Foi demonstrado outrossim, que sinais clínicos de melhora dos sintomas de congestão pulmonar também freqüentemente precediam qualquer efeito diurético demonstrável, sugerindo que fatores extra-renais pudessem estar envolvidos (Najak Z, 1993 ; Bland TD, 1978; Demling RH e Will JÁ, 1980). Estudos em animais também demonstraram que o diurético de alça furosemide diminui a filtração de fluidos vasculares, através de uma ação não diurética, agindo, provavelmente, na vasculatura pulmonar alterando o fluxo sanguíneo pulmonar. Sua ação máxima sobre a complacência pulmonar ocorre duas horas após uma primeira dose, persistindo até 4 horas, não sendo mantida na 6ª hora. A rápida queda da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo é, provavelmente, primariamente vascular em sua

origem, desde que marcadas mudanças na capacitância venosa acompanham este fenômeno (Alli J e col., 1979). Vários outros trabalhos relataram o efeito do furosemide sobre o volume sanguíneo Pulmonar. Bathia e col. (1969) estudaram e confirmaram esses efeitos, que já haviam sido observados por outros pesquisadores, sobre a mobilização de líquidos em pacientes com congestão pulmonar devido aos efeitos da alta altitude antes mesmo do efeito diurético ser observado (Biagi RW e Bapat BN, 1967). A ação da droga sobre a circulação pulmonar foi identificada aos 15 min após administração endovenosa e antes de se instalar a diurese. A diminuição de volume identificado alcançou a cifra de 23%, provavelmente ocasionados por vários eventos como diminuição do volume total de plasma, diminuição do retorno venoso, queda na pressão de enchimento ventricular e diminuição do débito cardíaco. Dikshit sugere que o mais precoce, e freqüentemente clinicamente importante efeito extra-renal do furosemide, são essas mudanças hemodinâmicas produzidas pela droga e refletem um efeito vascular ao invés de um mecanismo diurético (Dikshit K, 1973 ). Davidov M e Kakaviatos M (1967), estudando pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva, quantificaram essas alterações identificando uma diminuição de 20% do volume da circulação pulmonar, acompanhado de sensível melhora clínica, após a administração de 100 mg de furosemide. Najak Z e col, estudando 20 RN pré-termo com a Síndrome da Dificuldade Respiratória do Recém-nascido concluíram que o furosemide endovenoso, utilizado na dose de 1 mg/kg, podia ter um efeito pulmonar direto, não dose dependente, melhorando a função pulmonar, verificando que o efeito ocorria maximamente 2 horas após a administração, persistindo até a 6ª hora (Najak Z e col. 1993).

Dentre os diuréticos, o furosemide é o mais extensivamente estudado, tanto em pessoas normais, como em situações patológicas (Peltola P, 1967; Stein JH, 1968) sua

farmacocinética foi analisada em detalhe por Hammarlund MM e col. (1984), após a injeção intravenosa do diurético e com a colheita de amostras de sangue, através de um cateter central, efetuadas com intervalos de 25 minutos, por 24 horas. A partir deste estudo, vários fatores foram descritos, tais como: meia-vida biológica = 36 minutos, depuração plasmática total =  $63 \pm 10$  minutos, depuração renal =  $117 \pm 11$  ml/min; depuração extra-renal (metabolismo) = 45 ml/min (correspondendo a 72% do total). O furosemide é um ácido fraco, que é absorvido incompletamente pelo trato gastrointestinal. Em humanos, ocorre uma considerável variação inter-individual na sua biodisponibilidade, especulando-se que isto possa se dever, em parte, a problemas de solubilização. Seu comportamento em ratos difere principalmente com relação ao processo de absorção (Chungi VS, 1979). Também trabalhos em animais, carneiros e cães, tratados com furosemide demonstraram que a droga diminui a filtração de líquidos trans-vasculares através de um efeito não diurético, atuando provavelmente na microvasculatura, alterando o fluxo sanguíneo pulmonar (Bland TD e col., 1978; Demling RH e Will JA, 1980; Ali J, Chernick W e col., 1979).



#### **4 UTILIZAÇÃO DE MODELO ANIMAL PARA ESTUDAR O PROCESSO INFLAMATÓRIO EM ASMA**

A resposta da VA ao estímulo de um antígeno tem adquirido interesse particular para o desenvolvimento de pesquisas na área de doenças alérgicas pulmonares. Caracteristicamente, todos os pacientes com asma apresentam broncoespasmo imediatamente após a inalação de um antígeno (até 15 minutos após) e, ocasionalmente, uma outra reação ocorre entre a 4ª e a 6ª hora, após a exposição (reação tardia). Estudos desta última reação têm sido extremamente importantes para um melhor entendimento clínico da asma (Buse WW e col., 1993).

A reação asmática tardia apresenta uma série de achados da asma crônica, como menor resposta aos broncodilatadores, aumento da responsividade da VA e desenvolvimento de inflamação brônquica (Lemanske RF e Kaliner MA, 1988). Conseqüentemente, a análise desta reação tardia tornou-se um instrumento de grande valor para se estudar asma, buscando-se informações sobre o processo inflamatório tanto em humanos, como em modelos animais. Ainda que nenhum os modelos utilizados reproduzam todas as características da doença em humanos, estudos em camundongos e ratos tem a grande vantagem de que um grande número de linhagens híbridas possam ser disponibilizadas (Pauwels RA e col., 1997). Em muitos dos experimentos desenvolvidos com ratos, por exemplo, na tentativa de melhor entender os mecanismos envolvidos no broncoespasmo, foi observado que linhagens de ratos híbridos diferiam significativamente com respeito a sua responsividade basal a vários estímulos broncoconstritores, tais como a 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Pauwels RA, 1985). Inúmeros grupos de pesquisa têm estudado asma em animais pequenos, como

camundongos (BALB/c), utilizando a Ovalbumina OVA como forma de desencadear a doença pulmonar alérgica (Hamelmann E, 1999). A OVA é um importante alérgeno, que tem a vantagem de induzir, de forma confiável em humanos, uma resposta IgE antígeno-específica (Macino D, 1980; Renz H e col., 1992).

Diversas publicações têm relatado estudos sobre o mecanismo da doença pulmonar alérgica induzida pela OVA em camundongos, analisando a influência exercida pela linhagem genética dos animais, registrando-se significativas diferenças de comportamento (Zhang Y e col., 1997). Uma das melhores tentativas de sistematização, particularmente da sensibilização e dos passos necessários para que ocorresse uma ótima indução de hiperresponsividade da via aérea nas várias espécies de camundongos, foi realizada por Zhang e seus colaboradores. Dentre os vários protocolos utilizados por este estudo, o rendimento foi maior em termos de eosinofilia e hiperresponsividade brônquica, quando a sensibilização era realizada por via intra-peritoneal e, 14 dias após, por via inalatória, utilizando-se o mesmo alérgeno.

A estimulação da VA com OVA utilizando uma mesma linhagem, recebeu aprovação internacional como um modelo adequado para verificar os acontecimentos da fase tardia do processo asmático, tal como a resposta eosinofílica. (Nakajima HI e col., 1992; Renz, H e col, 1992; Brusselle, G e col., 1995). Camundongos BALB/c sensibilizados com OVA desencadeiam um significativo aumento do número de eosinófilos no lavado broncoalveolar, o mesmo não ocorrendo com o grupo controle (Regal JF e col., 2001).

## 5 JUSTIFICATIVA

Os estudos com o furosemide na asma têm sido relacionados a sua utilização por via inalatória como protetor do broncoespasmo induzido por uma série de estímulos diretos e indiretos como a histamina e o esforço físico, como broncodilatador e como anti-inflamatório (Anderson SD, 1991) . São poucos os relatos de estudos analisando os efeitos deste fármaco quando utilizado por via sistêmica, e principalmente , não existem relatos de estudos tentando identificar uma possível ação de interferência desta droga através de seus efeitos não diuréticos sobre o fluxo sanguíneo da vasculatura brônquica uma ação já bem identificada em outras situações que não asma (Peltola P, 1967; Stein JH, 1968). Essa capacidade de interferência específica sobre o fluxo sanguíneo da utilização dos diuréticos de alça por via sistêmica, não tem sido valorizada na fisiopatologia do processo asmático desde o início dos estudos com esta droga em pacientes com asma como comprova a inexistência de citações sobre o assunto em revisão pela Cochrane nos últimos 20 anos quando relacionados os termos furosemide/inflamação/fluxo sanguíneo pulmonar/asma. A possibilidade de comprovação de que, ao interferir no fluxo sanguíneo da vasculatura brônquica na asma, poder-se-ia interferir no tráfego de leucócitos, ainda de passagem no compartimento circulatório em direção aos seus sítios de ação nos tecidos - antes do início dos mecanismos de “rooling” e “adesion” - abriria um canal de ação terapêutico ao impedir que mais células com potencial inflamatório atinjam os sítios de ação (tecidos). Assim, levando em consideração todos esses elementos levantamos a

hipótese de que essas ações vasculares não diuréticas do furosemide poderiam modificar o fluxo de células inflamatórias direcionado a via aérea, que poderia ser detectado pela análise do Lavado Bronco-alveolar dos animais de estudo.

## 6 OBJETIVOS

- **Geral:**

1. Verificar o efeito do furosemide utilizado por via sistêmica na resposta Inflamatória pulmonar de camundongos sensibilizados com ovalbumina.

- **Específicos:**

1. Analisar a resposta celular no lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c tratados com furosemide por via sistêmica, sensibilizados com ovalbumina.
2. Analisar os níveis de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 no lavado broncoalveolar de Camundongos BALB-C tratados com furosemide utilizado por via sistêmica, sensibilizados com ovalbumina, .

## 7 MATERIAL / MÉTODOS

### 7.1 Animais do estudo – Camundongos

Foram utilizados camundongos Balb/c, fêmeas e adultos (6-8 semanas de vida), provenientes do biotério da Universidade de Campinas e mantidos sob condições ideais durante a realização do estudo no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

### 7.2 Sensibilização com OVA

Utilização de um Modelo Animal: Ratos Balb-C estimulados antígenoicamente com Ovalbumina (OVA). O estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O protocolo utilizado é resumido no fluxograma exposto na figura 3. Os camundongos foram acompanhados por 30 dias. A sensibilização alérgica foi feita através da utilização de OVA por via intraperitoneal (IP) no dia 1 (D1). Para este procedimento, foi utilizada uma dose de 200µl contendo 10µg de ovalbumina diluída em 100µl de PBS mais 100µl de alumen 1mg/ml aplicados com seringa de Insulina. Os camundongos foram então anestesiados com uma solução de ketamina e xilazina, aplicada por via intraperitoneal (**Fig. 1**). Preparou-se uma solução com 0,9 ml de ketamina e 0,1 ml de xilazina e aplicou-se 0,05 ml dessa solução (**Foto 1**).



**Foto 1** - Sensibilização com OVA – Utilização de seringa de Insulina para injeção subcutânea de OVA. Forma de utilização da Injeção de OVA por via intraperitoneal (IP) realizada no primeiro dia do estudo (D1) adicionado hidróxido de alumínio (alum) como adjuvante para sensibilização. A dose utilizada foi de 200 $\mu$ L, contendo 100 $\mu$ g de ovalbumina, diluída em 100 $\mu$ L de solução salina tamponada (PBS) mais 100 $\mu$ L de alum (1mg/mL). No D14 foi aplicada uma segunda dose de OVA utilizando-se os mesmos procedimentos.

### 7.3 Teste de broncoprovocação com OVA = Desafio Intra-nasal com OVA

O teste de broncoprovocação foi realizado no 14º dia após ter sido feita a segunda injeção sub-cutânea de OVA ( fase de sensibilização) através da aplicação dessa mesma substância por via intranasal por 3 dias consecutivos (D25, D26 e D27 (Foto 2 ). Inicialmente, os camundongos foram anestesiados com uma solução de quetamina e xilazina, aplicada por via IP. Preparou-se uma solução com 0,9 mL de ketamina e 0,1 mL de xilazina e aplicou-se 0,05 mL da solução. Esta anestesia é utilizada para facilitar a aspiração para as vias aéreas inferiores, da solução com OVA aplicada por via intra-nasal por manter o animal levemente acordado. O teste foi realizado com uma solução de 40µg de OVA, diluído em 40µl de PBS. Foram aplicados 20µl em cada narina, utilizando uma micropipeta com diâmetro semelhante ao diâmetro da narina do camundongo).





**Foto 2** - Desafio Intra-nasal com OVA - Realizado com 40 $\mu$ g de OVA diluído em 40 $\mu$ l de PBS e então aplicados 20 $\mu$ l em cada narina, utilizando uma micropipeta com diâmetro semelhante ao diâmetro da narina do camundongo . O nível de anestesia é apenas o suficiente para acalmar o animal mantendo-o alerta o suficiente para aspirar o material introduzido pela narina.

#### **7.4 Intervenção com furosemide**

O grupo em estudo recebeu furosemide por via IP durante os dias do desafio por via intranasal, 1 minuto antes do desafio IN na dose de 1mg/10g de peso do camundongo (média de 2mg/animal). O grupo controle recebeu injeção intraperitoneal com soro fisiológico.

#### **7.5 Lavado Bronco-Alveolar**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi realizado no D28, dois dias após o desafio com ovalbumina intranasal. Os camundongos foram novamente anestesiados com uma solução de quetamina (0,5 mL) e xilazina (0,5 mL), aplicando-se 0,2 mL IP da solução. Após a anestesia, foi realizada traqueostomia, com canulação da traquéia utilizando agulha de ponta romba com calibre semelhante ao diâmetro da traquéia. A agulha foi conectada a uma seringa de 1 mL, preenchida com solução fisiológica 0,9% (SF), que foi injetada lentamente e, após 10 segundos, cuidadosamente aspirada. O procedimento de instilação e aspiração intratraqueal foi repetido 3 vezes em cada LBA. O volume da amostra final foi calculado e enviado para processamento. O material que preenchia a seringa após a realização da última manobra de injeção/aspiração foi recolhido e levado a microscopia para contagem total e diferencial de células.

## 7.6 Contagem total e diferencial de células

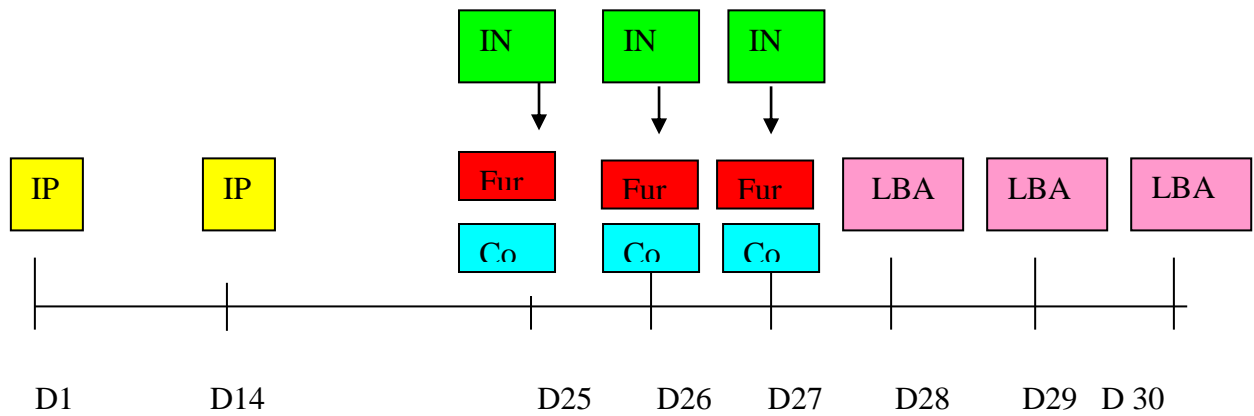
O material do LBA foi centrifugado a 2000 rpm, por 2 minutos e o sobrenadante separado. O precipitado foi diluído em 1mL de SF e, parte desta amostra (10 $\mu$ L), colocada na câmara de Neubauer, misturado com o corante azul de tripan (10 $\mu$ L). A contagem total e diferencial de células e a viabilidade da amostra foram realizadas sob microscopia óptica imediata (**Fig. 2 e 3**).

## 7.7 Análise das citocinas

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram mensuradas no sobrenadante das amostras de LBA, através do método de ELISA, segundo instruções do fabricante (Pharmingen, USA), no laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O limite inferior de detecção de TNF- $\alpha$  e IL-10 para este método foi de 7,8 pg/mL. Quando o nível de uma determinada amostra era indetectável, metade do limite inferior de detecção foi considerada para fins de análise estatística. O valor da citocina mensurada foi sempre ajustado para o volume da amostra coletada do LBA.

## **7.8 Fluxograma contagem diferencial de células**

A sensibilização antigênica dos animais de estudo com a aplicação intra-peritoneal de OVA em duas oportunidades separadas 14 dias uma da outra dias 1 e 14 (D1 e D14). O desafio antigênico da via aérea, foi realizado com a mesma substância a partir do 10º dia da última aplicação intra-peritoneal (D25, D26 e D27) tanto nos grupos de estudo do furosemide como no grupo controle. Lavado O Broncoalveolar foi realizado em todos animais a partir do 3º dia do desafio da via aérea para cada grupo sensibilizado (D28, D29 e D30).



**OVA** = Ovalbumina

**IP** = Injeção Intra-Peritoneal de OVA

**IN** = Instilação Intra-Nasal de OVA

**Fur** = Grupo de estudo com Furosemida

**GCo** = Grupo Controle  
**LBA** = Lavado Bronco-Alveolar

**Fig. 3 - Fluxograma**

## **8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foram utilizados os testes-t e de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição da amostra, para comparar as variáveis entre os grupos. As diferenças encontradas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 9 RESULTADOS

Do total de animais envolvidos no estudo, em apenas um não foi possível realizar o LBA devido ao rompimento da traquéia durante o procedimento de canulação da mesma.

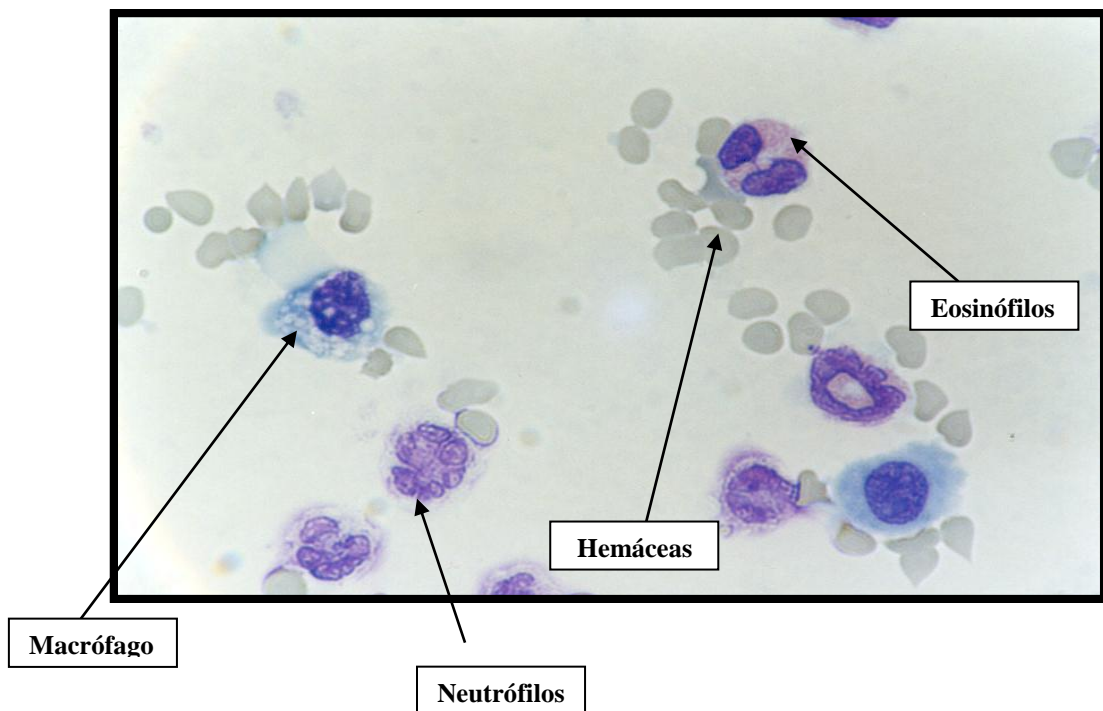
### 9.1 Análise da celularidade total e de Interleucinas no líquido do LBA

A análise do conteúdo da celularidade total e de Interleucinas e TNF-alfa entre os Grupos da medicação e grupo controle medidos em picogramas por ml (**Tabela 1**) não se observando diferenças com significância estatística entre os grupos de estudo com furosemide e os grupos controle pós desafio antigênico da via aérea. A foto 3 mostra a viabilidade da amostra utilizada para análise celular

	<b>Furosemide</b> ( n=13 )	<b>Controle</b> ( n= 12)	
<b>CTC</b> , mediana ( interquartil)	<b>0,16 (0,08-0,29)</b>	<b>0,15 ( ,009-0,34)</b>	p = 0.93
<b>IL-6</b> (pg/mL)	<b>17.4 (16.6 – 20.3)</b>	<b>27.2 (17.5 – 29.15)</b>	p = 0.087
<b>IL-10</b> (pg/mL) mediana ( interquartil)	<b>912.5 (498.9 – 1085.94)</b>	<b>554.9 (504.4 – 762)</b>	p = 0.53
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/mL) mediana ( interquartil)	<b>132.7 (7.7 – 162.8)</b>	<b>126.1 (7.7 – 142)</b>	p = 0.82

**Tabela 1** - Contagem total de células e concentrações das citocinas no lavado bronco-alveolar entre os grupos estudados.





**Foto 3** –Identificação da viabilidade celular a microscopia

## 10 DISCUSSÃO

O fato de não ter-se observado diferenças com significância estatística nos grupos celulares e de Interleucinas entre os animais de intervenção com o Furosemide e os grupos controles leva-nos a considerar 3 possibilidades: primeiro, que realmente a droga não seja efetiva por via sistêmica, como quando utilizada por via inalatória, o que é um fato já bem estabelecido, em pelo menos, no que se refere a proteção a Asma Induzida por Exercício ou desafio brônquico com metacolina (Bianco, 1988; Novembre E, 1994). Segundo, que a dose da medicação em estudo tenha sido inadequadamente baixa. Bonet Papell (Bonett, 1999) apresentou caso de um paciente em que algum efeito só foi observado quando foram utilizadas doses dobradas ( 40mg ) do furosemide por via sistêmica. De outra parte, nos estudos com furosemide utilizado por via inalatória, obteve-se um efeito protetor que foi dose-dependente enquanto que inefetivo quando utilizado por via sistêmica (Bianco, 1988). Hummarlund estudando a questão da dose efetiva, identificou uma diminuição da concentração de citocina extracelular a uma concentração de furosemide acima de  $2,5 \times 10^{-3}M$  que segundo os autores não poderia ser alcançado com a mesma droga dada por via sistêmica em doses clinicamente recomendadas (Hummarlund MM, 1984). Terceiro, que o momento da administração

também não tenha sido correto isto é, muito precoce e também único. A cinética da migração celular observada em modelos murínicos demonstra um pico de eosinófilos a partir do 3<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> dias após a via aérea ter sido submetida ao desafio antigênico (Tomaki M, 2000; Ohkawara 1997). Talvez a droga em estudo devesse ter sido administrada e mantida desde o primeiro dia do desafio da VA com OVA isto é, a partir do momento em que a essas células iniciam a sua migração e mantida até o momento do pico celular máximo no terceiro/ quarto dia pós desafio antigênico. Dr David Broyde, um dos pesquisadores da área de modelos animais para estudos do processo inflamatório da asma em comunicado pessoal disse desconhecer o que seria recomendável tanto em termos de dose como de momento ideal de administração para o furosemide.

De outra parte, levando-se em consideração os conhecimentos atuais sobre o processo inflamatório em geral e do processo asmático em particular, observa-se que o epitélio respiratório não é o único local anatômico responsável pela fisiopatogenia desta doença. A cascata de eventos conta com a participação ativa de três setores: da medula óssea (fonte principal das células inflamatórias - eosinófilos, macrófagos e mastócitos circulantes), da circulação brônquica (caminho obrigatório de passagem dessas células a caminho de seus órgãos alvo de ação, no caso da asma, a via aérea) e dos tecidos (o local final de ação das células inflamatórias em qualquer processo de injúria tecidual, no caso da asma o pulmão). Esses três setores formam o que poderíamos chamar de “compartimentos” ou “Pools” como os designaram McNee e seus colaboradores (McNee W, Selby C, 1993). Todos esses “compartimentos” são igualmente importantes e necessários para que a resposta inflamatória se faça presente em toda a sua plenitude. Entretanto, no processo asmático, o componente vascular é dos três o menos estudado e

o que menos referências ou citações apresenta na literatura principalmente com relação a sua importância como órgão de passagem embora, como os demais, de importância capital e portanto, não excludente, para o desenvolvimento do processo inflamatório final. As evidências dessa importância expressam-se através de vários níveis de conhecimento: 1) Existe um imenso leito vascular circundando a VA (Fig. 2). Estudos quantitativos realizados “in vivo” demonstraram um aumento do número total de vasos sanguíneos em pacientes com asma quando comparados aos seus controles. (Lix, Wilson JW, 1997; Salvato G, 2001). 2) Ocorre comprovadamente um aumento do volume sanguíneo dirigido aos tecidos pulmonares na asma (Kumar S, 1998). De outra parte, é reconhecido desde longa data que em casos de asma fatal, a mucosa da VA é edemaciada e contém vasos sanguíneos dilatados e congestionados. (Walzer I, 1952; Unger L. 1954; Dunnill MS, 1960). 3) As características histológicas da inflamação asmática, consistem em mudanças no fluxo bem como no calibre de pequenos vasos sanguíneos seguidos por alterações na permeabilidade vascular levando aos eventos leucocitários (Kay AB, 1987). O extravasamento celular, é peça chave do processo inflamatório como um todo (C. Pearson ; Kroegel C e col., 1994). Sabe-se igualmente, que muitas substâncias importantes na fisiopatogenia da asma são conhecidas como sendo causadoras de um aumento da permeabilidade vascular como, por exemplo, a bradicinina e a histamina, mediadores envolvidos na resposta inflamatória da asma (Laitinen LA, 1987; Chediak AD, Wanner A, 1991) favorecendo extravasamento de células e humores através dos vasos sanguíneos e, só algumas tem um efeito oposto sobre esta vasculatura como por exemplo os B2-agonistas (Whelan, 1992;

Sulakvelidze, 1994; Baluk, 1994) e os corticosteróides (Bowden, 1994). 4) A seqüestração de leucócitos no pulmão é governada pela retenção dessas células nos capilares e sua interação com o endotélio da microvasculatura de arteríolas e veias sendo a cinética deste fenômeno o determinante do equilíbrio entre leucócitos circulantes e seqüestrados (Kuebler WM, 1994). A partir dos primeiros procedimentos de visualização direta de leucócitos marcados “in vitro” na microcirculação pulmonar realizados por Lien e seus colaboradores foi demonstrado que o fluxo sanguíneo regional pulmonar é o maior determinante da retenção de leucócitos naqueles locais (Lien DC, 1987). Os estudos em camundongos e em vários outros mamíferos sob bloqueio (“Knock-out”) das moléculas de adesão, demonstraram que a nível molecular, as moléculas ICAM1 e VCAM1 são também criticamente importantes para o recrutamento tanto de eosinófilos como de células T após a exposição alergênica (Bochner BS, 2000). Entretanto, independentemente do tipo de célula envolvida o recrutamento de leucócitos para os tecidos como vimos, envolve uma série de etapas, a primeira delas tendo seu início quando as células que, ao realizarem a marginação, tem de resistir as forças da turbulência associadas ao fluxo sanguíneo (Bochner BS, 1998) - a força exercida pelo fluxo sanguíneo é calculada ser de 100-150 dinas/cm<sup>2</sup> na microcirculação pulmonar podendo prevenir a aderência ao endotélio, tanto de células normais como neutrófilos ativados (Worthen GS, 1987) demonstrando a importância dos acontecimentos dentro deste compartimento. Com relação a droga de estudo – Furosemide - os inúmeros trabalhos publicados nos últimos 20 anos no que se refere a utilização desta droga em asma como vimos, se referem a sua utilização por via

inalatória, demonstrando efeitos protetores contra vários estímulos antigênicos diretos e indiretos (Bianco S e col., 1988), como droga anti-inflamatória, agindo sobre células participantes desse processo como neutrófilos, monócitos, leucotrienos e citocinas (Moscatto G, 1991), ou por modificações em parâmetros ventilatórios como FEV1 e PFM, (Anderson, 1991; Yuengsrigul A, 1996). De outra parte, as propriedades da ação vascular desta droga a nível pulmonar, já foram extensivamente estudadas em outras circunstâncias que não asma, comprovando sua efetividade e que seriam independentes de seu efeito diurético. Em carneiros e cães, tratados com furosemide, droga diminuiu a filtração transvascular de fluidos através de um efeito não diurético agindo provavelmente na vasculatura alterando o fluxo sanguíneo pulmonar (Zeba Najak, 1983). Os relatos existentes sobre as ações sobre fluxo – ação vascular desta droga - em asma, referindo-se ao seu efeito sobre o equilíbrio térmico e hídrico da VA quer por via sistêmica ou sua utilização por via inalatória (Freed NA, 1996). Nenhuma citação, relato ou hipótese sobre uma possível ação sobre o fluxo sanguíneo capilar quando de sua utilização por via sistêmica em pacientes com asma como forma de interferir no tráfico de leucócitos aos tecidos. A possibilidade de uma interferência neste nível, diminuiria o extravasamento e conseqüentemente o aporte de células inflamatórias aos tecidos da via aérea o que não pudemos constatar com o protocolo utilizado.

## **11 CONCLUSÃO**

- 1** No modelo utilizado, o furosemide não foi capaz de interferir na resposta inflamatória pulmonar em camundongos previamente sensibilizados com ovalbumina em resposta a estimulação com o mesmo antígeno por via inalatória .
  
- 2** O furosemide não foi capaz de alterar a celularidade total identificada no lavado broncoalveolar nos animais em estudo.
  
- 3** Os níveis de IL-6, IL-10 e TNF  $\alpha$  no lavado broncoalveolar dos animais tratados com furosemide não foram diferentes quando comparados aos grupos controles .

## **12 PERSPECTIVAS FUTURAS**

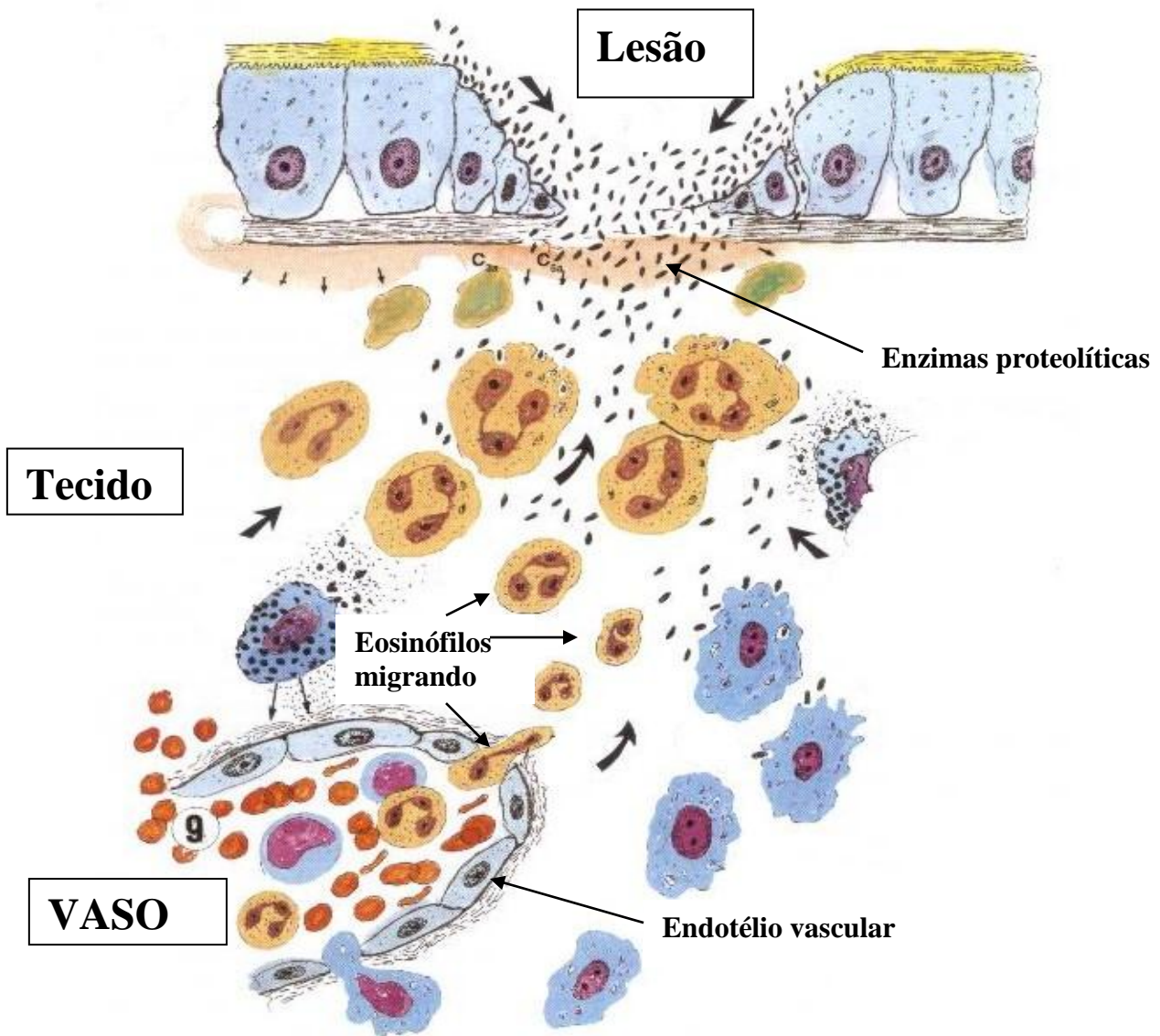
### **12.1 Necessidade de continuar a pesquisa**

Enquanto não forem solucionados os problemas de dose e do momento da administração do Furosemide por via sistêmica, os achados aqui apresentados que demonstram a não interferência desta droga na resposta inflamatória (medida pelo aporte de eosinófilos e interleucinas aos tecidos avaliados no lavado broncoalveolar) não permite com segurança avaliar a sua efetividade quando utilizado por esta via e com o modelo de sensibilização animal utilizado. Além do fator dose, deve também ser considerada a inclusão em próximas pesquisas, da busca de outras interleucinas no LBA, como a IL-5 e do GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor). A IL-5 é considerada como a citocina principal envolvida no desenvolvimento da eosinofilia em vivo (Chung KF, 1999) responsável pela diferenciação dos eosinófilos e de sua liberação da medula óssea encontrando-se sabidamente aumentada na resposta de camundongos em resposta a estimulação antigênica (Kung TT, 1955; Van Oostehout AJ 1995). O GM-CSF além das funções exibidas pela IL-5 também estimula a aderência endotelial a ativação e degranulação dos eosinófilos (Walsh GM, 1990). Shahabuddin S, demonstrou que estas células expostas tanto a Il-5 como GM-CSF aumentam significativamente a adesividade e transmigração endotelial em resposta a uma variedade de quimioattractantes incluindo outras citocinas (Shahabuddin S, 2000).



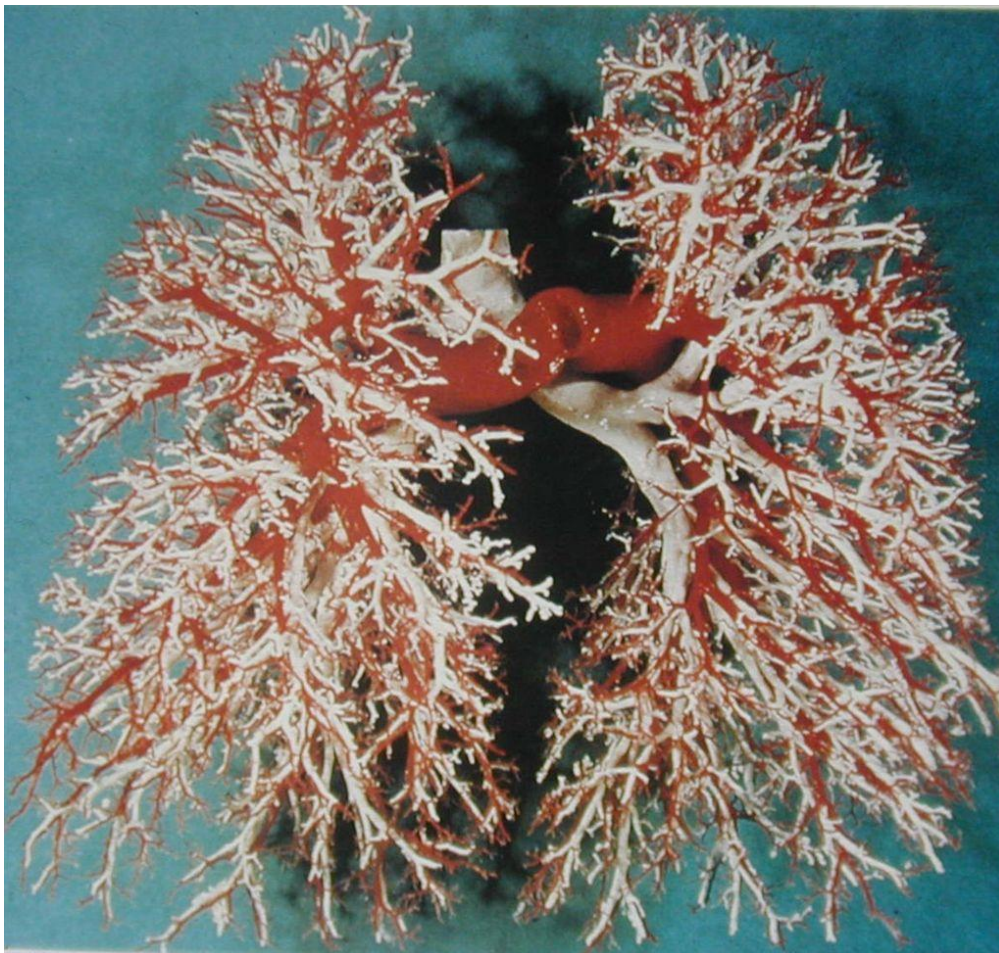
## 12.2 Importância do componente vascular no processo asmático

Sabemos que a cinética dos leucócitos na microcirculação é influenciada em larga escala pelas forças hemodinâmicas resultantes do fluxo sanguíneo através dos vasos (Gaehtgens P, 1985). A negatividade do estudo, ao nosso ver, não invalida ou diminui a importância do compartimento vascular, como vimos, o caminho natural e obrigatório de passagem de todas as células inflamatórias liberadas pela medula óssea a caminho de seus sítios de ação final nos tecidos (**Fig. 1**) quando da estimulação antigênica, uma vez que não foi utilizada técnica que pudesse escrutinar especificamente - fluxo sanguíneo.

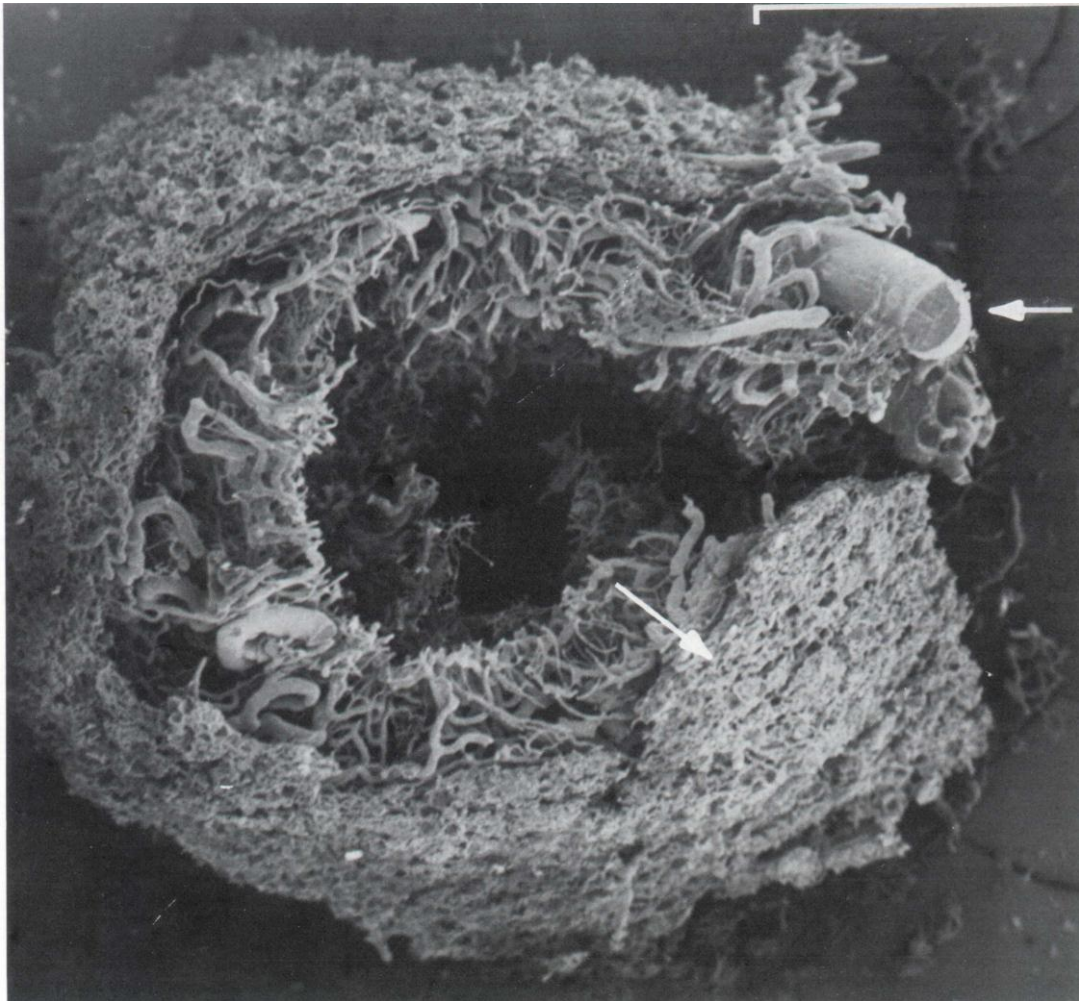


**Fig 1 - Cinética leucocitária** – migração dos eosinófilos por entre as células endoteliais após os mecanismos de rolagem e adesão finalizando com a liberação de suas enzimas proteolíticas e conseqüente lesão tecidual final

A observação da interferência sobre fluxo em vasos sanguíneos é hoje possível com o auxílio, entre outros métodos, da intravital videoscopia (Kuebler WM, 1994) onde a migração dos leucócitos marcados após a estimulação antigênica da via aérea é acompanhada pela microscopia e, mais recentemente, através de métodos não invasivos para os animais de estudo como a Ressonância Magnética, utilizada como forma de acompanhar a formação de edema após desafio intratraqueal com OVA (Beckmann N, 2001). (Fig.)



**Fig.1 – A circulação Pulmonar** – uma re imensa de vasos acompanhando a Via Aérea



**Fig. 2 – A circulação brônquica** – um imenso emaranhado de vasos circundando o bronquíolo - o vazio central corresponde a posição do brônquio

A análise detalhada da cinética leucocitária, é de primordial importância uma vez que a seqüestração é um pré-requisito indispensável para a sua adesão e emigração a parede endotelial (Ven-Adrian UH, 1991). Kuebler estudando o comportamento dos leucócitos sua retenção nos capilares pulmonares sua rolagem e parada nas arteríolas e veias, verificou que todos os segmentos da microcirculação pulmonar contribuem para a redução de sua velocidade de passagem pelo pulmão fazendo com que o tempo em que esse fenômeno ocorre determine o equilíbrio dinâmico entre o pool “circulante” e o “pool seqüestrado” (Kuebler W.M, 1994) e portanto, potencialmente, o número de leucócitos nos tecidos. Os mecanismos e a implicação terapêutica das alterações no fluxo nos vasos sanguíneos da via aérea começam a ser elucidados sendo que os acontecimentos na microvasculatura ainda representam um importante vazio no entendimento da fisiopatologia da asma (McDoanld, 2001). Há necessidade de continuar os estudos sobre qual a real importância desse compartimento de passagem como o denominamos e do furosemide ou de outros medicamentos com capacidade de interferir no fluxo sanguíneo pulmonar. Uma vez demonstrada a importância do primeiro e comprovada a possibilidade de nele interferir (fluxo sanguíneo), com medicamentos tanto os já conhecidos como furosemide ou outros que tenham este mesmo potencial, poderíamos vir a contar com um importante auxiliar na ação terapêutica anti-inflamatória geral e no tráfego leucócitos aos tecidos em particular, ao ensejar que menos células com potencial agressivo, aportem aos sítios de ação enquanto que aquelas que lá já estivessem presentes, sofreriam a ação tradicional dos anti-inflamatórios estabelecidos como os corticosteróides, numa ação conjunta e com considerável benefício direto ao paciente.

### 13 REFERÊNCIAS

ALII, J; CHERNICK, W; WOOD, LDH. **The effect of furosemide in canine low pressure pulmonary edema.** J Clin Invest 1979;64:1494.

ANDERSON, SD; HE, W; TEMPLE, DM. **Inhibition by furosemide of inflammatory mediators from lung fragments [ letter ].** New Engl J Med 1991;324:131.

ANDERSON, SD; HE, W; TEMPLE, DM. **Inhibition by furosemide of inflammatory mediators from lung fragments.** N Engl J Med 1991; 324:131.

BARNES, PJ. **Cytokines as mediators of chronic asthma.** Am J Respir Crit Care Med 1994;150:S42-9.

BATHIA, ML; SINGH I; MANCHANDA, SC et al. **Effect of furosemide on pulmonary blood flow volume.** Br Med J 1969; 2:551-552.

BATHIA, ML; SINGH, I; MANCHANDA, SC; KHANNA, PK; ROY, SB. **Effect of furosemide on pulmonary blood volume.** Brit Med J .1969;2:551-552.

BOCHNER, BS. **Cellular adhesion in inflammation.** In: Middleton E Jr, Reed C, Ellis E, Adkinson NF Jr, Yunginger J, Busse W, editors. *Allergy: Principles and Practices* 5<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 1998. p 94-107.

BOCHNER, BS. **Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology – Road signs guiding leukocytes along the inflammation highway.** *J All Clin Immunol* 2000;106:1-18.

BIAGI, RW; BAPAT, BN. **Furosemide in acute pulmonary oedema.** *Lancet* 1967; 1: 849.

BIANCO, S; ROBUSCH, M; VAGHI, A and Pasargiklian M. **Prevention of exercise-induced bronchoconstriction by inhaled furosemide.** *Lancet* 1988; 2:252-255.

BIANCO, S; VAGHI, A; ROBUSCHI, M. **Prevention of exercise-induced bronchoconstriction by inhaled Furosemide.** *Lancet* 1988;2:252-255.

BIRCH, AG; ZAKHEIM, RM; JONES, LG et al. **Redistribution of renal blood flow produced by furosemide and ethacrynic acid.** *Circ Res* 1967; 21:869-878.

BLAND, TD; MCMILLAN, DD; BRESSA, CKMA: **Decreased Pulmonary Transvascular Fluid Filtration in awake newborn lambs after intravenous furosemide.** *J Clin Invest* 1978;62:601.

BOCHMER, BS. **Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology.** J All Clin immunol 2000; 106:01-18.

BONET, Papell MG; MANZANO, RJ; PRATS, BARDAJI, MS. **Diuretic do treat asthma?** Arch Broncopneumol. 1999;35(5):248-249.

BRUSSELLE, G.; J Kips, G. Joos; H. Bluethman and R Pawels. **Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficiente mice.** Am J Respir Cell Mol Biol 1995;12:254-259.

BUSSE, WW; CALHOUN, WF; SEDGICK, JD. **Mechanisms of airway inflammation in asthma.** A. Rev Respir Dis 1993;147:S20-S24.

BUSSE, WW; PARRY, DE. **The biology of asthma.** In Fishman's pulmonary diseases and disorders 3rd ed. Vol 1, pp732, International edit. McGraw-Hill, 1998.

CARL, G.A; Persson. **Plasma Exudation chapter 64. In Asthma, edited by P J Barnes, M.M. Grunstein, A.R. Leff, and A.J.Woolcock.** Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997 pp917.

CARROL, N; COOKE, C and JAMES, A. **The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics.** Eur Respir.J.1997; 10:292-300.



CASSATELA, MA. **The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10.** Int J Clin Lab Res 1998;28:148-161.

CHEDIAK, AD; WANNER, A. **Effects of histamine on tracheal mucosal perfusion, water content and airway smooth muscle in sheep.** Respir Physiol 1991;84:231-242.

CHIN, TW; FRANCHI, LM, NUSSBAUM, E. **Use of aerolized furosemide in chronic Pediatric Asthma.** J All Clin Immunol 1992;89:237,(abstr. 369 ).

CHUNG, KF; BARNES, PF. **Cytokines in asthma.** Thorax 1999;54:825-857.

CHUNGI, VS; DITTERT, LW; SMITH PB. **Gastrointestinal sites of furosemide absorption in rats.** Int J Pharm 1979;4:27-38.

CIBA GUEST SYMPOSIUM. 1959. **Terminology, definitions and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions.** Thorax 14:286-299.

CLUTTERBUCK, EJ; HISRT, EMA; SANDERSON, CJ. **Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF.** Blood 1989; 73:1504-1512.

COLLOF, MJ; AYRES, J; CARSWELL, F; HOWARTH, PH; MERRETT, TG; MITCHELL, EB; ET AL. **The control of allergens of dust mites and domestic pets: a position paper.** Clin Exp Allergy 1992;2:1-28.

DAVIDOV, M; KAKAVIATOS, M and Finnertry F Jr. **Intravenous administration of furosemide in heart failure.** J American Medical Association 1967;200:824.

DAVIDSON, RM; GOLDMAN, J; WHALEN RE et al. **Hemodynamic effects of furosemide in acute myocardial infarction.** Circulation 1971; 44:suppl 2: 156.

DEERSCHUK, CM; ALLARD, MF; MARTIN, BA; MACKENZIE, Autor AP and HOOG, JC. **Marginated pool of neutrophils in rabbit lungs.** J appl Physiol 1987;63:1806-1815.

DEMLING, RH; WILL, JA: **The effect of furosemide on the pulmonary transvascular fluid infiltration rate.** Cir Res 1980;6:318.

DENBURG, JÁ; TELIZYN, S; BELDA, A; DOLOVICH, J; BIENENSTOCK, J. **Increased numbers of circulating basophils progenitors in atopic patients.** J Allergy Clin Immunol 1985;76:466-472.

DENBURG, JÁ. **Basophils, mast cells and eosinophils and their precursors in allergic rhinitis.** Clin Exp Allergy 1991;21:253-258.

DJUKANOVIC, R. **Asthma: a disease of inflammation and repair.** J Allergy Clin Immunol 2000;105:s522-s526.

DJUKANOVIC, R; ROCHE, WR; WILSON, JW et al. **Mucosal inflammation in asthma.** Am Rev Respir Dis 1990;142:434-457.

DON, C; JOHANSON, R. **The nature and significance of peribronchial cuffing in Pulmonary Edema.** Radiology 1977;125:577-582.

DUMONDE, DC; WOLSTENCRAFT, RA; PANAYI, GS; MATTHEW, M; MORLEY, J; HOWSON, WT. **“Lymphokines”: Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.** Nature 1969;224:238-342.

DUNNIL, MS. **The pathology of asthma with special references to changes in the bronchial mucosa.** J Clin Pathol 1960;13:27-33.

ELLIS, A. **The pathological anatomy of bronchial asthma.** Am J Med Sci 1980;136:407-429.

FABBRI, LM; DE ROSE, V; GODARD, P; BOSCHETTO, P; ROSSI, GA. **Guidelines and recommendations for the clinical use of bronchoalveolar lavage in asthma.** Eur Respir Rev 1992;2:116-123.

FADEN, H; OGRA, P. **Neutrophils and antiviral defense.** Pediatr Infec Dis 1986;5:86-92.

FAUL, J; THORNEY, VC; LEONARD, C; BURKE, J; FARMER, S; HORNE and POULTER, L. **The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics.** Eur. Respir J. 1997;10:301-308.

FRAENKEL, DJ; HOLGATE, ST. In Bierman CW, Pearlman DS, Shjapiro GG and Busse WW eds. **Allergy. Asthma, and Immunology from infancy to adulthood.** 3<sup>rd</sup> edit. Pp443, Asthma. 1996. WB Saunders Company.

FREED, NA; TASKAR, V; SCHOFIELD, B and Omori Chiharu. **Effect of furosemide on hyperpnea-induced airway obstruction, injury, and microvascular leakage.** J Appl Physiology 1996;81:2416-2467.

FRIZZELL, RA; FIELD, M; SCHULTZ, SG. **Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues.** Am J Physiol 1979;236:F1-F8.

GAEHTGENS, P; LEY, K; PRIES, AR and Muller R. **Mutual interaction between leukocytes and microvascular blood flow.** Prog Appl Microcirc 1985;7:15-28.

GILBERT, I; LENNER, KA; NELSON, JO A; WOLIN, AD; FOUKE, JM. **Inhaled furosemide attenuates hyperpnea-induced obstruction and intra-airway thermal gradients.** J Appl Physiol 1994;76(1):409-415.

GLEICH, GJ; ADOLPHSON, CR. **The eosinophil Leukocyte: Structure and Function.** ADV Immunol 1986;39:177-253.

GODARD, P; CHAINTREUIL, M; DAMON, M; COUPE, O; Crastes-de-Paulet, and Michel F B. **Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from sthmatics and normal subjects.** J. All. Clin. Immunol. 1982;70:893.

GORDON, EJ. **William Harvey and the circulation of the blood.** South Med J 1991;84:1439-1444.

GOSSET, P; TSICOPOULOS A; WALLAERT, B et al. **Tumor necrosis factor  $\alpha$  and inteleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation.** Am Rev Respir Dis 1992;146:768-774

GREENBAUM, LA; HOROWITZ, JB; WOODS, A; PASQUALINI, T. **Reich E-P, Bottomly K. Autocrine growth of CD4+ T cells.** J Immunol 1988;140:1555-15560.

HALEY, KJ; SUNDAY, ME; WIGGS, BR et al. **Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways.** Am J Respir Crit Care Med 1998: 158: 565-572.

HAMELMANN, E; TAKEDA K; SCHWARZE, J; VELLA, AT; IRWIN, CG; GELFAND, EW. **Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyoerrresponsiveness requires interleukin-5 but not Immunoglobulin-E or B-Lynphocytes.** Am J Respir Cell Mol Biol 1999;21:480-489 ).

HAMID, Q; SONG Y; KOTSIMBOS, TC et al. **Inflammation of small airways in asthma.** J Allergy Clin Immunol 1997; 100: S17-S22.

HAMMARLUND; MM; PAALZAW, LK dan Oblind B. **Pharmacokinetics of furosemide in man after intravenous and oral administration – application of moment analysis.** Eur J Clin Pharmacol 1984; 26:197-307.

HASKARD, DO; LEE TH. **The role of leukocyte-endothelial interaction in the accumulation of leukocytes in allergic inflammation.** Am Rev Respir Dis 1992;145:S10-S13.

HENDERSON, AF; HEATON, RW; COSTELLO, JF. **Effect of nifedipime on bronchoconstriction induced by inhalation of cold air.** Thorax 1983;38:512-515.

HOWARTH, P. **Small airway inflammation and asthma.** Int J Clin Pract Suppl 1998;96:15-22.

HUGES, T. **Anatomy. Microcirculation of the tracheobronchial tree.** Nature 1965;206:425-426.

HUMBERT, M; CORIGAN, CJ; KUNMMIT, P; TILL, SJ; KAY, AB; DURHAM. SR. **Relationship between IL-4 e IL-5mRNA expression and disease severity in atopic asthma.** Am J Respir Crit Care Med 1997;156:704-8.

INMAN, MD; WATTIE, J; DENBURG, JÁ; O`BYRNE, PM. **Allergen-induced increases in airway responsiveness, airway eosinophilia and bone marrow eosinophil progenitors im mice.** Am J Respir Cell Mol Biol 1999;21:473-479.

JEFFERY, P. **Bronchial biopsies and airway inflammation.** Eur Respir. J. 1996;9:1583-1587.

KAY, AB. **Mediator and inflammatory cells in allergic disease.** Annals of Allergy 1987;59 ( part II ):35-41.

KNOBIL, K; JACOBY, DB. **Mediator functions of epithelial cells.** In Holgate ST, Busse WW, eds. **Inflammatory mechanisms in asthma.** Lung Biology in Health and Disease 1998: 177:469-495. New York: Marcel Dekker.

KRAFT, MR; DJUKANOVIC, S; WILSON, S; HOLGATE and R.Martin.. **Alveolar tissue inflammation in asthma.** Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996;154:1505-1511.

KROEGEL, C; JR Virchow JC; LUTTMANN, W; WALKER, C; WARNER, JÁ. **Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leukocyte (Part II).** Eur respire J 1994;7:519-543.

KUEBLER, WM; KUHNLE; GEH; GROH, J; GOETZ, AE. **Leukocyte Kinetics in Pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study.** J Appl Physiology 1994;76:65-71.

KUMAR, S; EMERY, M; ATKINS, N; DANTA, I; WANNER, A. **Airway mucosal blood flow in bronchial asthma.** Am. J Respir Crit Care med 1998;158:153-156.

KUNG, TT; STELTS DM; ZURCHER, JA et al. **Unterferon Gama and antibodies to interleukin-5 and interleukin-4 inhibit the pulmpnary eosinophilia in allergic mice.**

Inflammation Res 1995;44 (suppl 2):S185-S186 ).

LAITINEN, LA, LAITINEN, A;, WIDDICOMBE, J. **Effects of inflammatory and other mediators on airway and other mediators on airway vascular beds.** Am Rev

Respir Dis 1987;135:567-570.

LARSEN, GL. **Differences between adult and childhood asthma.** J Allergy Clin

Immunol 2000;106:S153—7.S.

LEHMANN, AK; HALSTENSEN, A; SORNES, S; ROKKE, O, WAAGE, A. **High levels of interlukin-10 in serum are associated with fatality in meningoccal disease.**

Infect Immun 1995;63:2109-2112.

LEMANSKE, RF; KALINER, MA. **Late Allergic Reactions.** In: Middleton E Jr, Reed

LE, Ellis E, Adkinson NF Jr, Younginger J eds. Allergy: Principles an practices. St Luis; CV Mosby, 1988;224-274.

LIEN, DC; WAGNER Jr, WW; CAPES, C; HASLETT, WL; HANSON, SE;

HOFMEISTER, PM; HENSON, PM; WORTHEN, GS. **Physiological neutrophil sequestration in the lung, visual evidence for localization in capillaries.** J Appl

Physiol 1987;62:1236-1243.



LIX, Wilson JW. **Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma.** Am J Respir Crit Care Med 1997, 156:229-233.

MACINO, D; OVARY, Z. **Adjuvant effects of amorphous silica and of aluminum hydroxide on IgE and IgG1 production in different inbred mouse strains.** Int. Arch Allergy Appl Immunol 1980;61:253-258.

MAESTRELLI, P; SAETA, M A; DI-STEFANO, A; CALCAGNI, P G; TURATO, G; RUGGIERI, M P; ROGGERI, A; MAPP, CE and FABBRI, LM. **Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage.** Am J Respir Crit Care Med 1995;152:1921931.

MCDONALD, DM. **Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation.** Am J Respir Crit Care Med 2001;164:539-545.

McLAUGHLIN, RF Jr; TYLER, WS, CANADA, RO. **Subgross pulmonary anatomy of the rabbit, rat, and guinea pig, with additional notes on the human lung.** Am Rev Respir Dis 1966;94:380-387.

MELTZER, WJ; RICHERSON, HB; WORDEN, K, MONICK, M; HUNNINGHAKE, GW. **Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation.** Chest 1986;89:483-487.

MOSCATO, G; DELLABIANCA, A; FALAGIANI, P; MISTRELLO, G; Rossi, G and Rampulla C. **Inhaled furosemide prevents both the bronchoconstriction and**

**the increase in neutrophil chemotactic activity induced by ultrasonic “fog” of distilled water in asthmatics.** Am Rev Respir Dis 1991; 143:561-566.

NAJAK, ZD; HARRIS, EM; LAZZARA, A; PRUITT, AW. **Pulmonary effects of furosemide in preterm infants with lung disease.** J Pediatrics 1993;102:758,1983.

NAKAJIMA, HI; IWAMOTO, S; TOMOE, R; MATSUMARA, H; TOMIOKA, K  
TAKATSU and S Yoshida. **CD4+ T-Lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea.** Am Rev Respir Dis 1992;146:374-377.

NATIONAL ASTHMA EDUCATION AND PREVENTION PROGRAM. Expert panel report 2. **Guidelines for the diagnosis and management of asthma.** Bethesda (MD): National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute; NIH Publication 97-405.

NICHOL, GM; ALTON, EFW; NIX, A; GDDER, DM; CHUNG, KF and BARNES, PJ. **Effect of inhaled furosemide on metabisulfite- and methacholine-induced bronchoconstriction and nasal potential difference in asthmatic subjects.** Am. Rev Respir Dis 1990;142:576-580.

NOVEMBRE, E; FRONGIA, G; LOMBARDI, E et al. **The Preventive effect of nedocromil or furosemide alone or in combination on exercise-induced asthma in children.** J Allergy Clin Immunol 1994;94:201-206.

OHKAWARA, Y; LEI XF; STAMPFLI, MR; MARSHALL, JS; XING, Z; Jordana, M. **Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation.** Am J Respir Cell Mol Biol 1997;16:510-520.

PAUWELS, RA; GERMONPRÉ, PR; KIPS, JC; JOOS, GF. **Genetic control indirect airway responsiveness in the rat.** Clin Exp Allergy 1995.

PAUWELS, RA; JOOS, GF; KIPSN, JC. **Animal Models for Studying Genetics of Asthma**, in Asthma, edited by Peter Barnes, MM Grunstein, A.R.Lff, and A J Woolcock. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.

PAVORD, ID; WISNIEWSKI, A and TATTERSFIELD, AE. **Inhaled furosemide and exercise induce asthma: evidence of a role for inhibitory prostanooids.** Thorax 1992;47:797-800).

PELTOLA, P. **Furosemide (Lasix ) as a diuretic.** Acta Med Scand 1965;177:777-782.

PITREZ, PC. **Estudo da resposta inflamatória em lactentes com sibilância: Análise de IL-10 e celularidade no aspirado nasofaríngeo.** Tese Doutorado. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

POBER, JS; GIMBRONE, MA; MENDRICK, DL; FIERS, W; ROTHLEIN R et al. **Overlapping Patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, Tumor Necrosis Factor and Immune Interferon.** J Immunol 1986;137:1893-1896.

QATAYYAYSICIAN, S. **The Arabic Physician Ibn Nafis** (in Arabic). 1<sup>st</sup> Ed. Beirut: Arabic Corporation for Studies and Publication, 1984:37-43.

REGAL, JF; MOHRMAN, ME; SAILSTAD, DM. **Trimetillic Anhydride-induced Eosinophilia in a Mouse Model of Occupational Ashma**. Toxicology na Applied Pharmacology 2001;175: 234-242.

RENZ, H; H.R SMITH, J.E; HENSON, B.S; RAY, C.G; IRWIN and E. W. elfand. **Aerolized antigem exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse**. J Allergy Clin Immunol. 1992; 89:1127-1138.

RODEWELL, LT; ANDERSON, SD; DU TOIT, JI and SEALE, JP. **The effect o inhaled furosemide on airway sensitivity to inhaled 4,5% sodium chloride aerosol in asthmatic subjects**. Thorax 1993; 107:208-213.

RUOSLAHTI, E: **Integrins**. J clin Invest 1991; 87:1-5.

RYAN, GB; MAJANO, G. **Historic highlights** in: Thomas BA, editor. Inflammation, Kalamazoo: Upjhon; 1977 p 06-23.

SALVATO, G. **Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non asthmatic subjects**. Thorax 2001; 56:902-906.

SEHMI, R; HOWIE, K; SUTHERLAND; DR; SHARAGGE, W; O`BYRNE, PM; DENBURG, JÁ. **Increased levels of CD34 hematopoietic progenitor cells in atopic subjects.** Am J Respir Cell Mol Biol 1996;15:645-654.

SEIDENBERG, J; DEHNING, J and Von Der Hardt. **Inhaled furosemide against cold air induced-bronchoconstriction in asthmatic children.** Arch Dis Child 1992; 67:214-217.

SHAHABUDDIN, S; PONATH, P; SCHEIMER, RP. **Migration of eosinophils across endothelial monolayers: interactions among IL-5, endothelial activatingcytikines, and C-C Chemokines.** J Immunol 2000;164:3847-3854.

SHI H-Z; XIAO, C-Q; ZHONG, D; QUIN, S-M; LIU Y; LIANG, G-R et al. **Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics.** Am J Respir Crit Care Med 1998;157:204-9.

SHINER , RJ; NUMN, AJ; CHUNG, KF; GUEDES, DM. **Randomized double blind placebo-controlled trial of methotrexate in steroid-dependent asthma.** Lancet 1990; 336:137-140.

SILBERSTEIN, DS; DAVID, JR. **TNF as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity to schistosoma mansonii larvae.** Proc Natl Acad Sci USA 1986; 323:86-89.

SOLÉ, D; NASPITZ, CK. **Comparative efficacy of inhaled furosemide and disodium cromoglycate in the treatment of exercise-induced asthma in children.** J Allergy Clin Immunol 1997;99(2):204-209.

SPRY, CFJ. **Eosinophils. A comprehensive review and guide to scientific and medical literature .** Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1988.

STEIN, JH; WILSON, CB; KIRKENDALL, WM. **Differences in the acute effects of furosemide and ethacrynic acid in man.** J Lab Clin Med. 1968; 71:654-665.

STORMS, W; MICHELE, J; KNORR, B; NOONAN, G; SHAPIRO, G; ZHANG, J et al. **Clinical safety and tolerability of Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, in controlled clinical trials in patients aged  $\geq$  6 years.** Clin Exp Allergy 2001;31:77-87.

SYNEK, M; BEASLEY, R; FREW, AJ et al. **Cellular infiltration of the airways in asthma in varying severity.** Am J Respir Crit Care Med 1996; 154:224-230.

TAYLOR, BM; KOLBASA, KP; CHIN, JE; RICHARDS, IM; FLEMING, E; GRIFFIN RL; FIDLER, SF; SUN, FT. **Roles of adhesion molecules ICAM1 and alpha 4 integrin in antigen-induced changes in permeability associated with lung inflammation in sensitized brown Norway rats.** Am J Respir Cell Biol;1997;17, n° 6, 757-166.

THIEN, F. Leulotriene antagonists. **Do they offer new hope for asthmatics?** Aust Fam Physician 2000;29:547-551.

UNGER, L. **Pathology of bronchial asthma with five autopsy reports.** South Med J 1954; 38:513-523.

VAN OOSTEHOUT, AJ; FATTAH, D; VAN ARK, I et al. **Eosinophil infiltration precedes development of airway hyperreactivity and mucosal exudation after intranasal administration of interleukin-5 to mice.** J Allergy Clin Immunol 1995;96:104-112.

VARGAS, FS; CROCE, M; TEIXEIRA, LR; TERRA-FILHO, M; CUKIER, A AND LIGHT, RW. **Effect of inhaled furosemide on the bronchial response do lysine-aspirin inhalation in asthmatic subjects.** Chest 1992; 102:408-411.

VEN-ADRIAN, U; CHAMBERS, JD; MCEVOY, LM; BARGAISE, RF; ARFOS, KE; BUTCHER, EC. **Two step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles of LECAM-1 and leukocyte beta-2 integrins invivo.** Proc Natt Acad Sci, USA 1991;88: 7538-7542.

WALSH, GM; HARTNELL, A; WARDLAW; AJ; KURIHARA, K; SANDERSON, CJ; SAY, AB. **IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a luocyte integrin (CD11/18)-dependent manner.** Immunology 1990;71:258-2265.

WALZER, I; FROST, TT. **Death occurring in Bronchial asthma: a report of five cases.** J Allergy 1952;23:204-214.

WANNER, A; BARKER, JÁ; LONG, WM; MARIASSSY, AT; CHEDIAK, AD. **Measurement of airway mucosal perfusion and water volume with an inert soluble gas method.** J Appl Physiol 1988;65:264-271.

WELSH, MJ. **Inhibition of chloride secretion by furosemide in canine tracheal epithelium.** J Membrane Biol 1983;71:219-226.

WEST, JB; DOLLERY, CT; HEARD, BE. **Increased vascular resistance in lower zone of the lung caused by perivascular edema.** Lancet 1964;2:181-183.

WORTHEN, GS; SMEDLEY, SLA; TONNESEN, MG; ELLIS, D; VOELKEL, NF; REEVES, JT et al. **Effects of shear stress on adhesive interaction between neutrophils and cultured epithelial cells.** J Appl Physiol 1987;63:2031-2041.

Who/NHLBI Workshop Report 1995. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention.** National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, MD. Publication j n° 95-3659.



WONG, J; JOHNSON, B; LEE, SS; BULLARD, DC; SMITH, CW; BEAUDET, AL; KUBES, P. **A minimal role for selectine in the recruitment of leukocytes into inflamed liver microvasculature.** J Clin Invest 1997;99:2782-2790.

WOOD, LJ; SEHMI, R; DORMAN, S; HAMID, Q; TULIC, MK; WATSON, RM; FOLEY, R, WASI, P; DENBURG, JA; GAUVREAU, G; O'BYRNE, P. **Allergen-induced increases in Bone Marrow T Lymphocytes and Interleukin-5 Expression in subjects with asthma.** Am J Respir Crit Care Med 2002;166:883-889.

XU, H; GONZALO, JÁ; PIERRE, Ys et al. **Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule-1 deficient mouse.** J Exp Med 1994; 180:95-109.

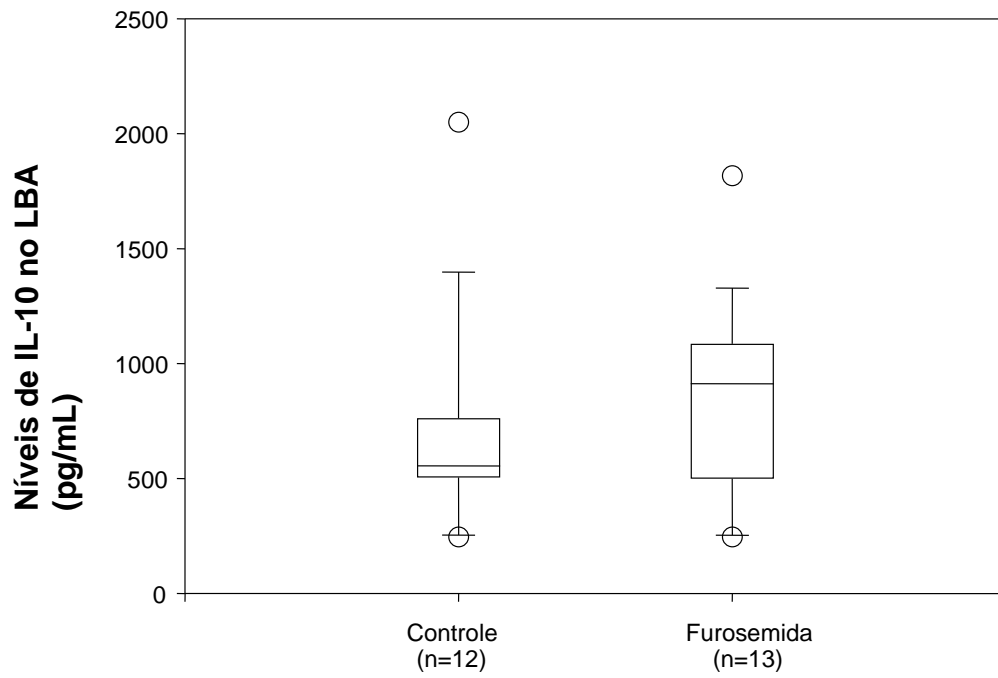
YUENGRIGUL, A; CHIN, TW; Nussbaum. **Effect of furosemide on interleukin 6 (IL-6) from human peripheral blood mononuclear cell (PBN).** Am J Resp Critical Care Med 1996; 153:A345.

ZHANG, Y; LAMM, WJE; ALBERT, RK; CHI, EY; HENDERSON, Jr WR and LEWIS, DB. **Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response.** Am J Respir Crit Care Med 1997;155:661-669.

ZHU, Z; TANG, W; RAY, A et al. **Rhinovirys stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro: evidence for nuclear factor-kB-dependent transcriptional activation.** J Clin Invest 1966;97:421-430.

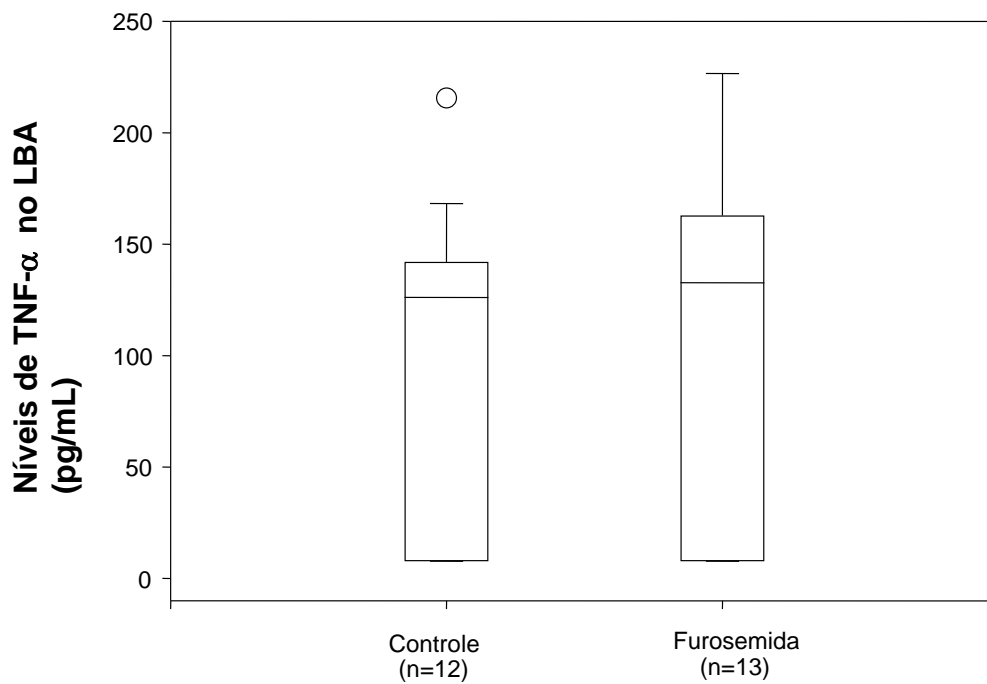
**ANEXOS**

## Anexo I

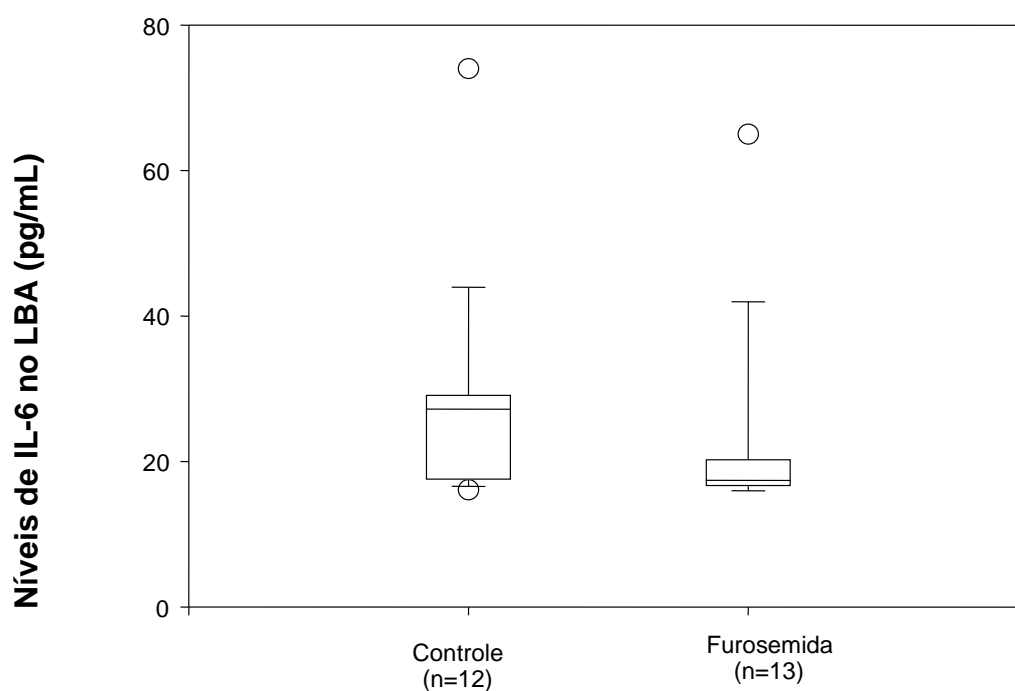
**Gráfico 1 - Níveis de IL-10 no Lavado Bronco-Alveolar medidos em pg/mL pelo método Elisa**

## Anexo II

**Gráfico 2 - Níveis de TNF $\alpha$  no Lavado Bronco-Alveolar medidos em pg/mL no grupo furoseimide e grupo controle**



**Gráfico 3. Níveis de IL-6 medidos no Lavado Broncoalveolar no grupo furoseimide comparado ao grupo controle.**



## Anexo III

Gráfico 4 - Contagem Total de Células no Lavado Bronco-Alveolar

