

# Desenvolvimento de um modelo experimental de indução de resposta pulmonar neutrofílica em camundongos\*

## Development of an experimental model of neutrophilic pulmonary response induction in mice

LEONARDO ARAÚJO PINTO<sup>1</sup>, CAMILA CAMOZZATO<sup>2</sup>, MONIQUE AVOZAN<sup>2</sup>, DENISE CANTARELLI MACHADO<sup>3</sup>, MARCUS HERBERT JONES<sup>4</sup>, RENATO TETELBOM STEIN<sup>4</sup>, PAULO MÁRCIO CONDESSA PITREZ<sup>5</sup> (TE SBPT)

**Introdução:** Várias doenças pulmonares caracterizam-se por inflamação predominantemente neutrofílica. O melhor entendimento do mecanismo de ação de alguns medicamentos na inflamação das vias aéreas dessas doenças pode trazer avanços no tratamento.

**Objetivo:** Desenvolver um método para induzir uma resposta neutrofílica pulmonar em camundongos, sem infecção ativa.

**Métodos:** Foram utilizados oito camundongos Swiss adultos. O grupo em estudo (n = 4) recebeu um desafio intranasal com *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) mortas, por congelamento, na concentração de  $1 \times 10^{12}$  UFC/ml. O grupo controle (n = 4) foi submetido a um desafio intranasal com soro fisiológico. Dois dias após o desafio intranasal, foi realizado lavado broncoalveolar (LBA), com realização de contagem total de células e celularidade diferencial.

**Resultados:** A contagem total de células foi significativamente superior no grupo com Psa, em relação ao grupo controle (mediana de  $1,17 \times 10^6$  e  $0,08 \times 10^6$ , respectivamente,  $p = 0,029$ ). Além disso, foi encontrado predomínio absoluto de neutrófilos na celularidade diferencial dos camundongos que receberam o desafio com Psa.

**Conclusão:** O modelo de indução de doença pulmonar neutrofílica com bactérias mortas, após congelamento, foi desenvolvido com sucesso. Este modelo de indução de resposta inflamatória neutrofílica no pulmão de camundongos Swiss pode ser um importante instrumento para testar o efeito antiinflamatório de alguns antimicrobianos na inflamação das vias aéreas inferiores. (*J Pneumol* 2003;29(4):213-6)

*Descritores* – Experimentação animal. Neutrófilos. Doenças pulmonares. *Pseudomonas*. Inflamação.

**Background:** Several lung diseases are characterized by a predominantly neutrophilic inflammation. A better understanding of the mechanisms of action of some drugs on the airway inflammation of such diseases may bring advances to the treatment.

**Objective:** To develop a method to induce pulmonary neutrophilic response in mice, without active infection.

**Methods:** Eight adult Swiss mice were used. The study group (n = 4) received an intranasal challenge with  $1 \times 10^{12}$  CFU/ml of *Pseudomonas aeruginosa* (Psa), frozen to death. The control group (n = 4) received an intranasal challenge with saline solution. Two days after the intranasal challenge, a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed with total cell and differential cellularity counts.

**Results:** The total cell count was significantly higher in the group with Psa, as compared to the control group (median of  $1.17 \times 10^6$  and  $0.08 \times 10^6$ , respectively,  $p = 0.029$ ). In addition to this, an absolute predominance of neutrophils was found in the differential cellularity of the mice that had received the Psa challenge.

**Conclusion:** The model of inducing a neutrophilic pulmonary disease using frost-dead bacteria was successfully developed. This neutrophilic inflammatory response induction model in Swiss mice lungs may be an important tool for testing the anti-inflammatory effect of some antimicrobial drugs on the inflammation of the lower airways.

*Key words* – Animal experimentation. Lung diseases. Inflammation. Neutrophils. *Pseudomonas*.

\* Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS, Equipe de Pneumologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Hospital São Lucas.  
Financiamento: CNPq.

1. Residente de Pneumologia Pediátrica.

2. Bolsista de iniciação científica.

3. Professora Adjunta do Departamento de Medicina Interna.

4. Professor Adjunto do Departamento de Pediatria. Doutor em Pneumologia.

5. Médico da Equipe de Pneumologia Pediátrica. Doutor em Pneumologia. Título de especialista pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.

Endereço para correspondência – Leonardo Araújo Pinto, Rua Itaboraí, 455/201 – Porto Alegre, RS. Tel./fax (51) 3335-3279; e-mail: leopinto@brturbo.com

Recebido para publicação em 7/4/03. Aprovado, após revisão, em 30/4/03.

## INTRODUÇÃO

Várias doenças ou infecções respiratórias induzem uma resposta inflamatória predominantemente neutrofílica no pulmão, tais como fibrose cística, pan-bronquiolite difusa e bronquiolite viral aguda.<sup>(1-3)</sup> Melhor entendimento da fisiopatogenia e do mecanismo de ação de medicamentos utilizados nessas doenças pode trazer benefícios em relação à terapêutica.

Algumas medicações, como os macrolídeos, podem apresentar efeito antiinflamatório em doenças pulmonares, além do efeito antimicrobiano.<sup>(2,4,5)</sup> O desenvolvimento de um modelo de inflamação pulmonar neutrofílica, sem infecção, é fundamental para a realização de pesquisas com esse tipo de medicação. Estudos recentes com eritromicina, pertencente ao grupo dos macrolídeos, e utilizada para tratamento de infecções bacterianas, demonstraram que esse agente pode inibir a quimiotaxia de neutrófilos, sendo a interleucina-8 uma das substâncias mais importantes envolvidas nesse processo.<sup>(5,6)</sup> Outros estudos demonstraram que a eritromicina retarda o metabolismo dos corticosteróides, o que poderia causar ou potencializar o efeito antiinflamatório dos macrolídeos.<sup>(7)</sup> Além disso, o uso de eritromicina por períodos prolongados (pelo menos dois meses) mostrou-se clinicamente efetivo no tratamento da pan-bronquiolite difusa, uma doença caracterizada por inflamação difusa predominantemente nos bronquíolos.<sup>(8)</sup> Outros macrolídeos, como azitromicina, também apresentaram efeito antiinflamatório, em estudos realizados em pacientes com fibrose cística.<sup>(9)</sup>

Protocolos para indução de infecção pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) vivas em modelos animais já são bem estabelecidos.<sup>(10,11)</sup> O uso do lipopolissacarídeo bacteriano para estimular resposta imune no pulmão também é uma forma de modelo experimental já utilizada.<sup>(4,12)</sup> Contudo, não foi encontrado nenhum estudo prévio que analisou a eficácia da utilização de bactérias mortas na indução de resposta inflamatória pulmonar neutrofílica em modelos animais. Esse tipo de protocolo seria tecnicamente de fácil execução e baixo custo.

O objetivo do presente estudo é desenvolver um método para induzir resposta neutrofílica pulmonar em camundongos Swiss, sem infecção bacteriana ativa.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados oito camundongos Swiss, adultos (seis a oito semanas), machos, provenientes do biotério da PUCRS. Tais camundongos foram mantidos no Instituto de Pesquisas Biomédicas, durante a realização do estudo.

---

### Siglas e abreviaturas utilizadas neste trabalho

CTC – Contagem total de células  
LBA – Lavado broncoalveolar  
PBS – *Phosphate buffered saline*  
Psa – *Pseudomonas aeruginosa*  
SF – Solução fisiológica  
UFC – Unidade formadora de colônias

---

### Protocolo para indução de neutrofilia pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa*

As Psa foram fornecidas pelo laboratório de microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS em uma placa de cultura. Após raspagem da placa, o material foi diluído em uma solução salina fosfatada (PBS), para uma concentração de  $1 \times 10^{13}$  UFC/mL. As Psa foram mortas através de congelamento do material (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), para que o efeito antimicrobiano neste tipo de experimento fosse suprimido. A solução com Psa foi novamente diluída até  $1 \times 10^{12}$  UFC/ml, para realização do desafio intranasal.

O grupo em estudo ( $n = 4$ ) recebeu um desafio intranasal com Psa (Dia 0), para induzir resposta inflamatória neutrofílica nas vias aéreas inferiores. Foram instilados 80  $\mu\text{l}$ , via intranasal, sob sedação. O grupo controle ( $n = 4$ ), ao invés da solução com Psa, recebeu um desafio intranasal com solução fisiológica (SF), com o mesmo volume instilado.<sup>(13,14)</sup> A sedação consistiu na administração de 0,1 mL, intraperitoneal, de uma combinação de quetamina (0,4 mL), xilazina (0,1 mL) e SF (0,5 mL), para permitir a aspiração pulmonar da solução com Psa, devido à perda do reflexo das vias aéreas superiores.

### Lavado broncoalveolar

Dois dias após o desafio intranasal, com Psa ou SF, foi realizado o lavado broncoalveolar (LBA). Os camundongos foram anestesiados com a mesma solução de quetamina e xilazina utilizada no desafio intranasal, sendo utilizada uma dose de 0,2 mL, intraperitoneal. Após a anestesia, foi realizada traqueostomia com canulação da traquéia e fixação do tubo. Foi instilada uma alíquota de 1 mL de SF, com uma seringa. Após cinco segundos de pausa, o material era aspirado. Tal instilação foi repetida três vezes, com a mesma solução.

### Contagem total de células e exame citológico diferencial

A amostra de LBA era pesada e centrifugada (2.000 rpm, por dois minutos). O precipitado era diluído em 1 mL de PBS. Foram realizadas contagem total de células (CTC) e viabilidade celular a partir dessa suspensão, em todas as amostras, através da coloração com azul de tripan, em câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha).

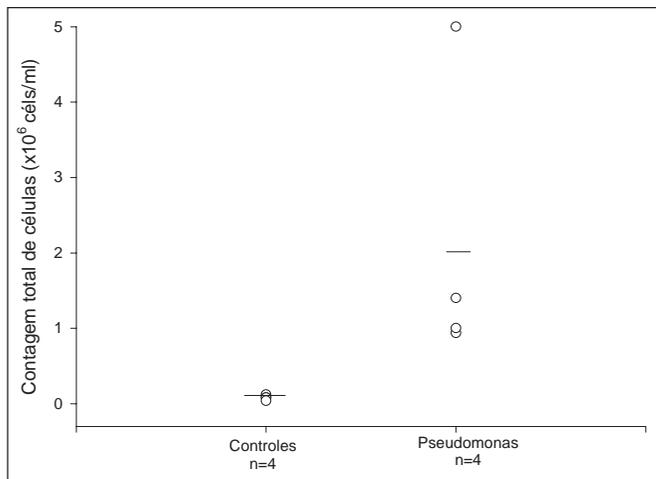


Figura 1 – Comparação da contagem total de células no LBA entre os grupos estudados

Para preparação de lâminas para citologia diferencial, 40 $\mu$ l da suspensão eram processados em citocentrífuga (FANEM, São Paulo, Mod. 218), a 500rpm, por cinco minutos. As lâminas foram fixadas com álcool metílico e coradas com corante May Grunwald Giemsa. As células foram analisadas conforme sua morfologia. Os tipos de células observadas ao microscópio óptico, foram expressas em porcentagem, após contagem de 200 células.

#### Análise estatística

Os valores são descritos como média ou mediana e a diferença estatística foi calculada pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças encontradas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

#### Ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Instituição e foi realizado com base nas normas utilizadas para pesquisas em modelos animais.<sup>(15)</sup>

#### RESULTADOS

A CTC no LBA foi significativamente superior no grupo que recebeu Psa, quando comparado com o grupo controle. A mediana foi de  $1,17 \times 10^6$  e  $0,08 \times 10^6$  nos grupos Psa e controle, respectivamente ( $p = 0,029$ ). Além disso, foi encontrado predomínio absoluto de neutrófilos (média: 82%) na celularidade diferencial no grupo de camundongos que recebeu desafio com Psa. O grupo controle não apresentava número significativo de neutrófilos no LBA (média: 0%). Os resultados referentes a CTC e o percentual dos neutrófilos no LBA dos dois grupos estudados são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

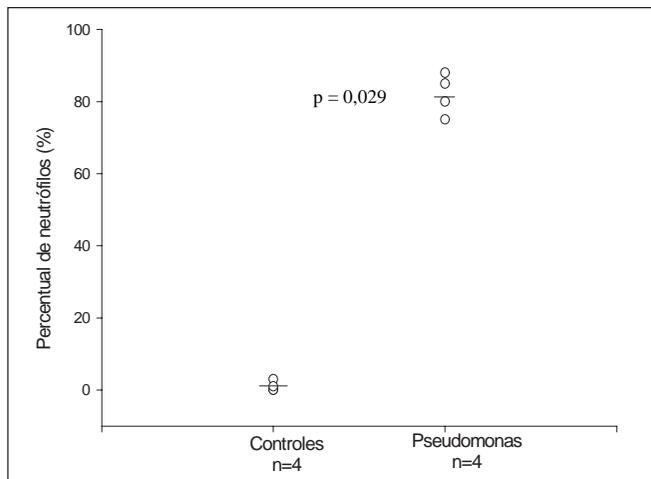


Figura 2 – Comparação do percentual de neutrófilos no LBA entre os grupos estudados

te. A viabilidade das amostras estudadas no grupo que recebeu Psa e no grupo controle foi de 80% e 85%, respectivamente.

#### DISCUSSÃO

Através desse modelo experimental, foi possível desenvolver um método para induzir resposta neutrofílica pulmonar em camundongos, sem infecção bacteriana ativa. Foram demonstrados aumento significativo no número total de células e predomínio absoluto de neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos Swiss com inflamação pulmonar induzida por bactérias.

Existem diversos modelos experimentais para indução de inflamação pulmonar. Um dos mais conhecidos é um modelo de indução de inflamação eosinofílica utilizado para pesquisa em asma. Esse método utiliza camundongos Balb/c, que são animais alérgicos à ovalbumina (OVA). Aplica-se essa proteína para sensibilização alérgica, através de injeções intraperitoneais. A mesma proteína é utilizada para o desafio, que pode ser por nebulização ou por via intranasal. Um ou dois dias após o desafio, deve ser realizado o LBA. Esse modelo é amplamente utilizado para pesquisa em asma. Diferentes drogas podem ser testadas através dele, além de outros fatores que podem influenciar a inflamação pulmonar eosinofílica na asma. Outro modelo bastante conhecido utiliza a inoculação de bactérias vivas. É um modelo utilizado principalmente para pesquisa em fibrose cística. É muito útil para testar o efeito antimicrobiano de muitas medicações.

A utilização de *P. aeruginosa* vivas para induzir uma doença pulmonar neutrofílica em camundongos já é descrita e utilizada.<sup>(10,11)</sup> O fato de que alguns antibióticos apresentam efeito antiinflamatório e a necessidade de

testar seu efeito e potência antiinflamatória em algumas doenças tornam o modelo do presente estudo bastante útil, induzindo-se inflamação neutrofílica, sem infecção bacteriana ativa.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um modelo compatível para pesquisa em doenças pulmonares com inflamação neutrofílica, mas sem infecção bacteriana ativa. Existem outros modelos que utilizam a inoculação de vírus ou lipopolissacarídeos (LPS), mas são de custos mais elevados e complexos para sua utilização na maioria dos laboratórios de pesquisa no Brasil.<sup>(4,12)</sup> Neste trabalho, reproduzimos um modelo semelhante com uma forma mais simples e acessível aos laboratórios brasileiros. Como as bactérias patogênicas em geral não resistem a temperaturas extremas, o congelamento causa a morte das *P. aeruginosa*. Este método constitui-se em uma forma simples e de baixo custo na indução de inflamação pulmonar em modelos animais. Além disso, o uso do desafio intranasal simplifica o método de indução quando comparado com modelos de instilação intratraqueal.<sup>(4)</sup> Os modelos que utilizam vírus também necessitam investimentos maiores, considerando que o cultivo e os métodos de infecção com vírus, em geral, são mais complexos.<sup>(16,17)</sup>

Assim, o presente modelo de inflamação neutrofílica pode tornar-se um instrumento importante para pesquisa em doenças como fibrose cística, bronquiolite viral aguda e bronquiolite obliterante. Além dos antibióticos macrolídeos, os corticosteróides, antileucotrienos, diuréticos e imunossupressores são exemplos de algumas drogas que podem ser testadas e comparadas através desse modelo experimental.

Este modelo experimental é original em relação a outros modelos já descritos, por descrever uma forma simples e acessível de desenvolver inflamação pulmonar neutrofílica. É um protocolo de curta duração, que não envolve procedimentos complexos como cultura de vírus, inoculação traqueal através de intubação ou utilização de câmaras de nebulização para o camundongo. O material utilizado é de baixo custo e a inflamação pulmonar é intensa.

Concluindo, foi desenvolvido um método simples e de baixo custo de indução de doença pulmonar neutrofílica com bactérias mortas em camundongos. Este método pode potencialmente ser utilizado para estudos experimentais farmacológicos no tratamento de doenças como bronquiolite aguda, fibrose cística ou bronquiolite obliterante.

## REFERÊNCIAS

1. Leigh MW, Knowles MR, Boucher RC. Cystic fibrosis: genetics and disease mechanisms. In: Taussig LM, Landau LI, editors. Pediatric respiratory medicine. St Louis: Mosby, 1999;991-1008.
2. Jaffé A, Bush A. Antiinflammatory effects of macrolides in lung disease. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:464-73.
3. Everard ML, Swarbrick A, Wright M, McIntyre J, Dunkley C, James PD, et al. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 1994;71:428-32.
4. Kadota J, Sakito O, Kohno S, Sawa H, Mukae H, Oda H, et al. A mechanism of erythromycin treatment in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:153-9.
5. Oda H, Kadota J, Kohno S, Hara K. Erythromycin inhibits neutrophil chemotaxis in bronchoalveoli of diffuse panbronchiolitis. *Chest* 1994; 106:1116-23.
6. Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohiama T, Sato M, et al. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:266-71.
7. Fost DA, Leung DM, Martin RJ, Brown E, Szeffler SJ, Spahn JD. Inhibition of methylprednisolone elimination in the presence of clarithromycin therapy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1031-5.
8. Nagai H, Shishido H, Yoneda R, Yamaguchi E, Tamura A, Kurashima A. Long-term low-dose administration of erythromycin to patients with diffuse panbronchiolitis. *Respiration* 1991;58:145-9.
9. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax* 2002;57:212-6.
10. Yanagihara K, Tomono K, Saway T, Hirakata Y, Kadota JI, Koga H, et al. Effect of clarithromycin on lymphocytes in chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:337-42.
11. Morissette C, Skamene E, Gervais F. Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immunol* 1995;63:1718-24.
12. Tulic MK, Holt PG, Sly PD. Modification of acute and late-phase allergic responses to ovalbumin with lipopolysaccharide. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:119-28.
13. Zhang Y, Lamm WE, Albert RK, Chi EY, Henderson WR, 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;155:661-9.
14. Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR. Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1150-6.
15. Suckow MA, Danneman P, Brayton C. The laboratory mouse. Boca Raton: CRC Press, 2000.
16. Sato K, Suga M, Akaike T, Fujii S, Muranaka H, Doi T, et al. Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:853-7.
17. Prince GA, Horswood RL, Camargo E, Koenig D, Chanock RM. Mechanisms of immunity of respiratory syncytial virus in cotton rats. *Infect Immunol* 1983;42:81-7.